

Aus dem  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Zur Wirksamkeit von Propoliszubereitungen bei  
Otitis externa des Hundes sowie  
Untersuchungen der antibakteriellen, antiviralen  
Aktivitäten von ethanolschen Propolisextrakten und deren  
Wirkung auf Zellkulturen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
JAN HOLZ  
Tierarzt aus Moskau  
Berlin 1999

Journal-Nr.2258

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ. - Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Univ. - Prof. Dr. W. Heinze
Zweiter Gutachter:	Priv. Doz. Dr. H. Nattermann
Tag der Promotion:	23. April 1999

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Literaturübersicht zum Stand der wissenschaftlichen Propolisforschung</b>	<b>3</b>
2.1.1 Entstehung und Bedeutung der Propolis im Bienenvolk	3
2.1.1.1 Theorien der Propolisentstehung	3
2.1.1.2 Funktionen der Propolis im Leben des Bienenvolkes	4
2.1.1.3 Propolisinstinkt verschiedener Bienenrassen	5
2.1.1.4 Zeiten des Propolissammelns durch die Bienen	6
2.1.1.5 Rohstoffquellen der Propolis	6
2.1.2 Charakteristik der Propolis	8
2.1.2.1 Physikalische Charakteristik der Propolis	8
2.1.2.2 Chemische Zusammensetzung	8
2.1.3 Pharmakologische Eigenschaften von Propolis	13
2.1.3.1 Antibakterielle Eigenschaften	13
2.1.3.2 Antimykotische Eigenschaften	16
2.1.3.3 Antivirale Eigenschaften	18
2.1.3.4 Unterstützende Wirkung auf immunologische Faktoren	19
2.1.3.5 Antiparasitäre Eigenschaften	21
2.1.3.6 Sonstige pharmakologische Eigenschaften	22
2.1.3.7 Nebenwirkungen und Toxizität	24
2.1.4 Ergebnisse der Propolisanwendung in der Veterinärmedizin	27
<b>2.2 Zum Erregerspektrum und lokaler Therapiemöglichkeit der Otitis externa des Hundes</b>	<b>37</b>
2.2.1 Erregerspektrum der Otitis externa des Hundes	37
2.2.2 Lokale Therapiemöglichkeiten bei Otitis externa des Hundes	40
2.2.3 Resistenzsituation bei den wesentlichen Erregerarten der Otitis externa	42

<b>3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Zur Wirkung von Propoliszubereitungen bei der Otitis externa des Hundes</b>	<b>43</b>
3.1.1 Material und Methoden	43
3.1.1.1 Gewinnung und Extraktion der Propolis	43
3.1.1.1.1 Gewinnung des Propolistrockenextraktes	44
3.1.1.1.2 Herstellung der Propoliszubereitungen	44
3.1.1.2 Geräte	45
3.1.1.3 Patientenmaterial	45
3.1.1.4 Klinische Untersuchungen und Ausgangsbefunde	46
3.1.1.4.1 Beurteilung der Cerumenbeschaffenheit	48
3.1.1.4.2 Otoskopiebefunde	50
3.1.1.5 Probenentnahme für die bakteriologische und mykologische Untersuchung	51
3.1.1.6 Therapiemaßnahmen	51
3.1.2 Ergebnisse	52
3.1.2.1 Ergebnisse der bakteriologischen und mykologischen Untersuchungen	52
3.1.2.2 Therapieergebnisse	55
3.1.2.2.1 Wirkungsvergleich beider Propoliszubereitungen	57
3.1.2.2.2 Beobachtungen während der Therapie	57
<b>3.2 Untersuchung der Wirkung von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt auf Bakterien, Pilze und Hefen</b>	<b>59</b>
3.2.1 Material und Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf anaerobe Bakterien	59
3.2.1.1 Propolistrockenextrakt	59
3.2.1.2 Anaerobe Bakterienstämme	59
3.2.1.3 Nährböden	60
3.2.1.4 Untersuchung der Propolistrockenextraktwirkung auf anaerobe Bakterien	60
3.2.1.4.1 Bestimmung der minimalen hemmenden Konzentration (MHK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien	61
3.2.1.4.2 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien	61

3.2.2 Material und Methoden des antibakteriellen und antimykotischen Wirksamkeitsvergleiches von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt	63
3.2.2.1 Propolis und Pappelknospen	63
3.2.2.2 Bakterien- und Pilzstämmen	64
3.2.2.3 Nährböden	65
3.2.2.4 Geräte	65
3.2.2.5 Antibakterieller und antimykotischer Wirksamkeitsvergleich von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt gleicher Provenienz	66
3.2.2.6 Vorversuche	67
3.2.3 Ergebnisse	68
3.2.3.1 Wirkung von Propolistrockenextrakt auf anaerobe Bakterien	68
3.2.3.1.1 Minimale hemmende Konzentration (MHK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien	68
3.2.3.1.2 Minimale bakterizide Konzentration (MBK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien	69
3.2.3.2 Antibakterieller und antimykotischer Wirksamkeitsvergleich von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt	70
<b>3.3 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Viren</b>	<b>75</b>
3.3.1 Material und Methoden	75
3.3.1.1 Propolistrockenextrakt	75
3.3.1.2 Viren	75
3.3.1.3 Zelllinie und Zellkultur	75
3.3.1.4 Geräte	76
3.3.1.5 Vorversuche	76
3.3.1.6 Untersuchung der antiviralen Aktivität von Propolistrockenextrakt	76
3.3.1.7 Plaquetests	77
3.3.2 Ergebnisse	78
3.3.2.1 Antivirale Aktivität von Propolistrockenextrakt	78
3.3.2.2 Ergebnisse der Plaquetests	83
<b>3.4 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Zellkulturen</b>	<b>85</b>
3.4.1 Material und Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf veterinärmedizinisch relevante Zelllinien	85
3.4.1.1 Propolistrockenextrakt sowie Herstellung der Testlösungen	85
3.4.1.2 Zelllinien und Zellkultur	85
3.4.1.3 Geräte	86
3.4.1.4 Vorversuche	86

3.4.1.5 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Zelllinien	87
3.4.2 Material und Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Proliferation in Zelllinien	88
3.4.2.1 Propolistrockenextrakt	88
3.4.2.2 Zelllinie und Zellkultur	88
3.4.2.3 Geräte und Reagenzien	89
3.4.2.4 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Proliferation der HaCaT-Zelllinie mit der Proliferationsmessung nach der Kristallviolettmethode	89
3.4.2.5 Serologischer cELISA auf die Virusproteine gp 51 und p 24	90
3.4.3 Ergebnisse	91
3.4.3.1 Wirkung des Propolistrockenextraktes auf Zellkulturen	91
3.4.3.2 Ergebnisse der Proliferationsmessung nach der Kristallviolettmethode an der HaCaT-Zelllinie	93
3.4.3.3 Ergebnisse des serologischen cELISA auf die Virusproteine gp 51 und p 24	96
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>98</b>
<b>4.1 Zur Wirkung von Propoliszubereitungen bei der Otitis externa des Hundes</b>	<b>98</b>
<b>4.2 Wirkung von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt auf Bakterien, Pilze und Hefen</b>	<b>101</b>
<b>4.3 Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Viren</b>	<b>104</b>
<b>4.4 Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Zellkulturen</b>	<b>106</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>110</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>112</b>
<b>7 LITERATUR</b>	<b>114</b>
<b>8 VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>134</b>
<b>9 LEBENS LAUF</b>	<b>135</b>
<b>10 DANKSAGUNG</b>	<b>136</b>

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Das in den letzten Jahren gestiegene Interesse an Naturheilverfahren und Naturheilmitteln in medizinischen Fachkreisen und in der Öffentlichkeit sowie eine neue Sichtweise der Methoden der Volksmedizin führten zur Wiederentdeckung von in Vergessenheit geratenen pharmakologisch wirksamen Naturprodukten, von denen einige als sinnvolle Ergänzung zum vorhandenen Spektrum von Arzneistoffen für die Therapie bestimmter Erkrankungen in der Veterinärmedizin eingesetzt werden können. Zu diesen bewährten Naturprodukten gehört die Propolis, die in der Volksmedizin vor allem des südost- und osteuropäischen Raumes hochgeschätzt und breit angewendet wird. Dank ihrer komplexen chemischen Zusammensetzung besitzt Propolis eine Vielzahl pharmakologischer Wirkungen. Einige von ihnen sind wissenschaftlich untersucht, vor allem in der Humanmedizin.

Ausdruck des wachsenden Interesses an der Propolis ist eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten in den 80er und 90er Jahren, die sich überwiegend mit der chemischen Zusammensetzung der Propolis und deren möglichen Anwendung in der Humanmedizin beschäftigen.

Auf veterinärmedizinischem Gebiet mangelt es an aussagekräftigen wissenschaftlichen Untersuchungen über die Propolis und ihrer klinischen Anwendung. Daher schienen Untersuchungen auf veterinärmedizinischem Gebiet geboten, die Praxis und Theorie umfassen. Für die vorliegende Arbeit werden folgende Ziele formuliert:

Im Literaturteil werden zahlreiche biologische Eigenschaften der Propolis dargelegt. Davon ausgehend, erschien eine Überprüfung der Effizienz von unter Laborbedingungen hergestellter propolishaltiger Zubereitungen bei der Behandlung der Otitis externa des Hundes unter klinischen Bedingungen sinnvoll. Der Einfluß der Erregerpalette der Otitis externa auf die Wirksamkeit der Propoliszubereitungen wird untersucht, indem in einem Teil der Otitis externa-Fälle bakteriologische und mykologische Untersuchungen durchgeführt werden. Die Wirkung der Propoliszubereitungen im Therapieverlauf wird dokumentiert. Ein Vergleich der therapeutischen Effizienz zweier propolishaltiger Zubereitungen mit verschiedenen Propolistrockenextraktgehalten und verschiedenen Trägermedien wird vorgenommen.

Über die Wirkung der Propolis auf das veterinärmedizinisch relevante anaerobe Erregerspektrum fehlen in der Literatur spezifische Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von Propolistrockenextrakt auf anaerobe Bakterien, die bei der Dermatitis digitalis des Rindes eine entscheidende Rolle spielen, durch Ermittlung der MHK-Werte (minimale hemmende Konzentration) untersucht. Die genaue Kenntnis dessen ist bedeutsam für weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine mögliche Behandlung der Dermatitis digitalis mit propolishaltigen Galenika.

In weiteren mikrobiologischen Untersuchungen wird ein In-vitro-Vergleich der antibakteriellen und der antimykotischen Wirksamkeit von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt gleicher Provenienz und Jahreszeit durchgeführt. Als Rohstoff zur Herstellung medizinischer Präparate steht die Propolis nur in begrenzten Mengen zur Verfügung. Demgegenüber sind Pappelknospen in größerem Umfang vorhanden. Die Ausscheidungen der Pappelknospen stellen, wie aus dem Literaturteil zu entnehmen ist, in einigen geographischen Regionen die wichtigste Rohstoffquelle der Propolis dar. Der Extrakt aus Pappelknospen könnte demnach einen die Propolis substituierenden Rohstoff darstellen. Da die meisten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mit Propolis einer Imkerei ausgeführt werden, die Bienen also ihren Rohstoff stets aus der gleichen Region, von den gleichen Pflanzen, vorwiegend von Pappeln sammeln, lassen sich hypothetische Schlüsse zu eventuellen biologischen Wirkungen des Pappelknospenharztrockenextraktes eben dieser Region ziehen.

Ausgehend von den Literaturangaben über die antivirale Aktivität von Propolis auf einige humanmedizinisch bedeutsame Viren schien es sinnvoll, die antivirale Wirkung von Propolis auch an einigen veterinärmedizinisch relevanten Viren aus den Familien der Herpesviridae, der Retro- und Rhabdoviren zu testen.

Die Wirkung verschiedener Propolistrockenextraktkonzentrationen auf bestimmte, häufig in der veterinärmedizinischen Virologie zur Anwendung kommende permanente und nichtpermanente Zellkulturen wird untersucht. Es wird angestrebt, die Bereiche der Konzentration des Propolistrockenextraktes im Nährmedium der Zellkulturen zu bestimmen, in denen eine zytotoxische Einwirkung nicht oder in reversiblen Maße vorliegt. Weiterhin wird die Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Zellproliferation von verschiedenen vom Tier und Menschen stammenden Zelllinien untersucht.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Literaturübersicht zum Stand der wissenschaftlichen Propolisforschung**

#### **2.1.1 Entstehung und Bedeutung der Propolis im Bienenvolk**

##### **2.1.1.1 Theorien der Propolisentstehung**

Zur Entstehungsweise der Propolis gibt es keine einheitliche und endgültige wissenschaftlich fundierte Erklärung. Nach der altertümlichen Version wird Propolis, ähnlich wie Pollen und Blütenstaub, von den Bienen gesammelt und zum Bienenstock gebracht. Auf die pflanzliche Herkunft der Propolis haben bereits Aristoteles in seiner "Tierkunde", Plinius II. in "Naturalica historia" und Dioskorides hingewiesen. Auch andere Verfasser aus der Antike berichteten darüber, wie die Bienen das Kittharz von den Pflanzen gesammelt und in die Beute getragen haben. Diese Meinung herrschte bis Ende des 19. Jahrhunderts vor.

Anfang des 20. Jahrhunderts vertrat KÜSTENMACHER (1911) die Ansicht, daß die Propolis zum größten Teil von der klebrigen Oberschicht der Pollenkörner stammt, die im Chylusmagen der Bienen unter Einfluß von Wasser und Fermenten abgeschwemmt und in Form von Tröpfchen ausgespien wird. Durch die Bienenfüße wird Propolis dann im ganzen Stock verteilt. Verschiedene Deutungen dieser Theorie führten dazu, daß einige Autoren Propolis als Sekret der Verdauungsdrüsen bezeichneten. So vertrat PHILIPP (1928) die Ansicht Küstenmachers, daß Kittharz ein Stoffwechselprodukt der Bienen sei. Jedoch blieb die Ansicht von Aristoteles zur Entstehung der Propolis weiterhin aktuell. RÖSCH (1927) behauptete, daß das im Bienenstock verwendete Kittharz ein Sammelprodukt der Arbeitsbienen ist. Nach Ansicht von KIWALKINA (1964) wäre es aber irreführend zu behaupten, daß die Propolis von den Bienen in einer bereits fertigen Form gesammelt wird. Die Propolis ist nicht einfach identisch mit den Harzstoffen der Pflanzen, sondern stellt einen Komplex verschiedener Substanzen dar. Von den Pflanzen sammeln die Bienen zunächst nur die Rohstoffe, die dann mit Wachs und anderen Zusätzen, unter anderem auch mit Pollen, vermischt werden. Außerdem befinden sich in der Propolis Sekrete der Verdauungsdrüsen der Bienen, die während des Sammelns des Harzes von den Pflanzen und seiner Verarbeitung im Bienenstock in die Propolis gelangen. Folglich muß die Propolis als ein komplexes Gemisch von Stoffen sowohl pflanzlicher, als auch tierischer Herkunft betrachtet werden.

### **2.1.1.2 Funktionen der Propolis im Leben des Bienenvolkes**

Zur Zweckbestimmung der Propolis im Bienenstock sind alle Autoren einheitlicher Meinung. Die Propolis dient dem Bienenvolk als Baustoff zum Glätten von Unebenheiten, zum Verkitten undichter Stellen in der Beute und zum Verkleinern der Fluglöcher. Der Name "Propolis" (griech.: pro-vor, polis-Burg oder Stadtstaat) kommt von der Eigenart der Bienen, Schranken hinter den Fluglöchern zu bauen. Eine weitere wichtige Bedeutung hat die Propolis als keimhemmendes Mittel. Die neuen Wabenzellen und die inneren Wände der Beute, Rähmchen usw. werden mit einem dünnen Kittharzüberzug versehen.

In die Beute eingedrungene Tiere (Insekten, Mäuse, Eidechsen usw.), die nicht herausgeschafft werden können, werden mit Propolis überzogen und dadurch einbalsamiert. Auf diese Weise wird verhindert, daß sich von diesen Tierkörpern schädliche Pilze und Bakterien vermehren und ausbreiten können.

STEINER (1968) berichtete von den Arbeiten Chavins und Lavies, die eine stark verminderte Keimzahl im Inneren des Bienenstockes nachwies und die Körperoberfläche der Bienen frei von Bakterien fanden, obwohl die im Bienenstock herrschenden Temperaturen von 36-37°C und die hohe Luftfeuchtigkeit günstige Bedingungen für das Wachstum von Krankheitserregern darstellen.

Der Wachsgehalt von Propolis an verschiedenen Plätzen der Beute ist nach MAČIČKA et al. (1983) unterschiedlich hoch. Die „reinste“ Propolis fanden die Autoren mit einem geringen Wachsgehalt von 15,8-23,2% an den Seitenleisten. Propolis mit hohen Wachsanteilen von 32,4-56,3% wurden dagegen von der Mitte der Oberleiste gewonnen.

KORPATSCHOW (1989) teilte Propolis in drei Arten ein. Sie unterscheiden sich nach Zweck des Einsatzes durch die Bienen sowie in ihrem Wachsgehalt:

- Dickpropolis mit Zusatz von Wachs, Pollen und Staubkörnchen wird zum Verkitten von Ritzen und Rissen verwendet,
- Flüssigpropolis wird zum Schleifen der Wände und für die Bearbeitung von Wabenzellen genutzt,
- Mittelpropolis wird zum Zusammenkleben des Bienennestes eingesetzt.

### **2.1.1.3 Propolisinstinkt verschiedener Bienenrassen**

Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß der Propolisinstinkt der Biene im Verlaufe der Entwicklung des Bienenvolkes als ein Schutzmechanismus gegen negative klimatische und hygienische Faktoren entstand. Dank ihrer niedrigen Wärmeleitung und Wasserundurchlässigkeit schützt die Propolis das Bienenvolk vor Kälte, Wärme, Regen und Wind und anderen negativen Witterungseinflüssen.

Der Propolisinstinkt ist bei den verschiedenen Bienenrassen unterschiedlich ausgeprägt. STAROSTENKO (1968) berichtete von Messungen, die er im Verlauf mehrerer Jahre in Belorussland durchführte, daß die durchschnittlich gewonnenen Propolismengen von einem Rähmchen der Abmessungen 435 mm x 230 mm bei der Dunklen Waldbiene 0,825 g, bei der Grauen Kaukasischen Bergbiene 1,053 g, bei der Italienischen Biene 0,619 g, bei der Carnika Biene 0,553 g und der Fernöstlichen Biene 0,487 g Propolis betrug.

Nach VAGIN et al. (1992) zeichnen sich im osteuropäischen Raum von allen gehaltenen Bienenrassen die Graue Kaukasische Bergbiene und die Carnika Biene durch hohe Propoliserträge aus.

Die jährlich eingetragene Propolismenge pro Volk schwankt in Abhängigkeit von den Witterungseinflüssen nach BARMENKOW (1961), GUZALJUK (1973) und WAHONINA (1989) zwischen 120 und 200 g. Nach GUZALJUK (1976) können ohne Schaden für die Existenz des Bienenvolkes bis zu 80 g der Jahresmenge Propolis entnommen werden.

KOMAROW (1993) berichtete, daß am Einbringen der Propolis lediglich eine geringe Anzahl der Bienen des Volkes, etwa 30 Jungbienen, beteiligt sind. Diese über 15 Tage alten Bienen bringen bei 3-4 Sammelflügen täglich pro Sammelflug etwa 10 mg Propolis ein. Somit beträgt die durchschnittliche Sammelmasse an Propolis pro Bienenvolk an einem Tag etwa 1 Gramm.

Beim Sammeln der Propolis entwickeln die Arbeitsbienen einen besonderen Sammelmechanismus. Im Bienenstock eingetroffen, können sie sich nicht selbst von ihrer Last befreien. Jüngere Bienen beißen ihnen die Last in kleinen Portionen ab und bringen diese sofort an die Stellen der Beute, wo ein Bedarf besteht. Die auf das Sammeln von Propolis spezialisierten Sammelbienen bringen die Propolis nur zur wärmeren Tageszeit in die Beute, wo es sofort in möglichst warmem Zustand von den Bienen verarbeitet und deponiert wird.

#### **2.1.1.4 Zeiten des Propolis sammelns durch die Bienen**

Den Beobachtungen von MARLETTO (1983) nach beginnt das Propolis sammeln der Bienen in Norditalien im April. Es wird bis Ende Mai schwach und von Juni bis Oktober intensiv betrieben. Während der intensiven Sammelperioden wurden jedoch starke Schwankungen der Sammeltätigkeit beobachtet. Während des Sommers sammelten die Bienen zwischen 8 und 19 Uhr, im Frühjahr und im Herbst nur in den warmen Tagesstunden. Bis September wurde die meiste Propolis zum Verstärken der Rahmen und zum Auskleiden der Innenseite der Beute verwendet. Im Oktober wurden vor allem die Ritzen verkittet und das Flugloch verkleinert. VAGIN et al. (1992) konstatierten ebenfalls, daß das Kittharz nur an warmen Tagen bei Lufttemperaturen über 20°C in der Zeit von etwa 10 bis 15 Uhr von den Bienen eingebracht wird. In der Beute wird nach GRIMM (1983) das eingebrachte Harz durch Wachs gestreckt, wodurch es geschmeidiger wird.

#### **2.1.1.5 Rohstoffquellen der Propolis**

Eine Abhängigkeit der chemischen Propoliszusammensetzung von der die Bienen umgebenden „höheren Vegetation“ wurde von einigen Autoren festgestellt. Untersuchungen über die Zusammensetzung verschiedener Propolisarten, die von LAVIE et al. (1975) und POPRAWKO (1976) vorgenommen wurden, wiesen eindeutig auf eine gemeinsame Quelle des pflanzlichen Rohstoffes hin, den die Bienen bei der Propolisbereitung verwenden. Die Identifizierung dieser Quelle aufgrund der chemischen Taxonomieprinzipien und ihre Bestätigung durch die chromatographische Analyse von Pflanzenteilen (Pollen, Knospen verschiedener Art, verschiedener Pflanzenausscheidungen, Harzen) bewiesen, daß Propolis vor allem die Substanzen beinhaltet, welche die in der entsprechenden geographischen Region vorkommenden Baumarten ausscheiden. In Zentral- und Westeuropa sind das vorwiegend Pappelarten, in Osteuropa Birken- und Pappelarten und in Südeuropa Pappel- und Pflaumenarten.

Von BANKOVA et al. (1982) wurde die gleiche Flavonoidzusammensetzung in der Propolis nachgewiesen, die in Sekreten von Bäumen der Umgebung des Bienenstandortes ermittelt wurde. POPRAWKO (1976a, 1989) isolierte und identifizierte aus alkoholischen Extrakten von Birkenknospen (*Betula verrucosa*) in fast identischen Konzentrationen die gleichen Bestandteile wie aus Propolis dieser geographischen Zonen. Jedoch auch krautige Pflanzen wie Sonnenblumen liefern bei Abwesenheit von Bäumen in der Umgebung der Bienenstandorte den Rohstoff für die Propolis (KOMAROW, 1993).

Nach DROEGE et al. (1981), DROEGE (1984) ist die Grundsubstanz der Propolis das Harz von Knospenschuppen einiger Baumarten, hauptsächlich von Pappel, Birke, Robinie und Weide, aber auch von Kastanie, Fichte, Tanne und Kiefer. In einer Untersuchung mittels Dünnschichtchromatographie bewiesen PALOŞ et al. (1983) die Herkunft der Propolis aus Pappelknospen. KÖNIG et al. (1988) bezeichnete die Pappelknospen in den gemäßigten Breiten der Alten wie der Neuen Welt als „Hauptlieferant“ der Bienen. Die Zusammensetzung der phenolischen Inhaltsstoffe von Propolisproben und Exsudaten von Pappelknospen (*Populus x Euramerica*) gleicher Provenienz in Großbritannien stimmten überein, GREENAWAY et al. (1987). Die gleichen Autoren bestätigten 1988 ihre Aussagen anhand weiterer Untersuchungen von Propolis und Pappelknospenexsudaten gleicher Provenienzen verschiedener geographischer Standorte Großbritanniens. Bei HPLC- und GC-MS-Untersuchungen kanadischer Propolis durch GARCÍA-VIGUERA et al. (1993) wurden amerikanische Pappelarten (*P. deltoides*, *P. fremontii*, *P. maximowiczii*) als Hauptrohstoffquellen ermittelt. In Zentral- und Westeuropa und Teilen Osteuropas ist die Pappelpropolis sehr verbreitet. Ihre chemische Zusammensetzung ist weitgehend mit der Zusammensetzung der Knospenauscheidungen der Schwarzpappel (*Populus nigra*) identisch. Diese Ähnlichkeit stellte LAVIE et al. (1975a) für die in Frankreich gesammelte Pappelpropolis ebenso fest, wie POPRAWKO (1976a, 1976b) für Propolisproben aus Pappelzonen der ehemaligen UdSSR. Anhand chromatographischer Untersuchungen wies er folgende Hauptbestandteile nach: Flavone (Chrysin und Tectochrysin), Flavonole (Galangin und Isalpinin) und Flavonone (Pinocembrin). MARLETTO (1983) stellte fest, daß die Bienen in den Ebenen und dem Hügelland Norditaliens die Rohstoffe zur Propolisherstellung fast ausschließlich von den Knospen verschiedener Pappelarten sammeln. Die Harze und die Latices anderer in diesen Zonen befindlichen Pflanzen (*Aesculus hippocastanum*, *Castanea sativa* Mill., *Prunus avium* L., *Prunus persica* Stock. und *Prunus armeniaca* L.) wurden von den Bienen kaum oder nur ausnahmsweise gesammelt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Pappelknospen in Zentral- und Westeuropa und in Teilen Osteuropas die Hauptrohstoffquelle zur Propoliserzeugung durch die Bienen darstellen. Daher liegt die Vermutung nahe, daß auch eine große Übereinstimmung in den pharmakologischen Eigenschaften der Propolis und Pappelknospenharz vorliegt. Ein Hinweis dafür ist die teilweise Überlappung der Anwendungen beider Stoffe in der Volksmedizin verschiedener Völker Europas. So können Pappelknospenharze ein die Propolis substituierendes Naturprodukt darstellen.

## **2.1.2 Charakteristik der Propolis**

### **2.1.2.1 Physikalische Charakteristik der Propolis**

Die Propolisfarbe ist sehr variabel und reicht von gelblichen, rötlichen, grünlichen bis zu braunen Tönen. In Europa kommen jedoch öfter dunkelgrüne, bräunliche und graubraune Farbtöne vor. Der Propolisgeruch ist spezifisch, eigenartig und ähnelt dem Geruch von Pappelknospen, Honig und Vanille. Beim Verbrennen entsteht ein typischer Weihrauchgeruch. Der Propolisgeschmack ist bitter. Die spezifische Propolisdichte beträgt nach MUHA et al. (1988) 1,112-1,136 g/cm<sup>3</sup>. Die Schmelztemperatur liegt nach PESCHANSKIJ (1963) zwischen 80° und 104°C. Kalte Propolis ist spröde, ab 20°C wird sie knetbar und geschmeidig.

Propolis ist im Wasser nahezu unlöslich. Selbst im kochenden Wasserbad überschreitet die Löslichkeit kaum fünf Prozent. Der Wasserpropolisextrakt besitzt einen schwach sauren pH. In 50 bis 96%igem Ethanol lösen sich die meisten Bestandteile der Propolis. Der Ethanolextrakt ist eine klare hell- bis dunkelbraune Flüssigkeit mit alkalischem pH. Abhängig von der Propolismenge, die zur Extrakterstellung verwendet wird, und vom Wachsgehalt der Propolis beträgt die Propolislöslichkeit in Ethylalkohol 40-70%. Nach der Entfernung von Alkohol aus dem Extrakt verbleibt auf dem Gefäßgrund der Propolistrockenextrakt, der sich zu einer festen Masse verpressen läßt. 1 ml 20%iger Ethanolpropolisextrakt enthält 0,11-0,12 g Trockensubstanz. In heißem Methanol löst sich die Propolis vollständig auf.

Desweiteren wiesen WINOGRADOWA et al. (1964) auf eine gute Propolislöslichkeit in Äther, Azeton, Essigsäure und Salmiakgeist hin. Etwas geringer ist die Propolislöslichkeit in pflanzlichen, tierischen und mineralischen Ölen bzw. Fetten.

### **2.1.2.2 Chemische Zusammensetzung**

Obwohl die Propolis als Heilmittel seit dem Altertum eine breite Anwendung fand, wurde ihre chemische Zusammensetzung kaum untersucht. Erste Mitteilungen sind von KÜSTENMACHER (1911) bekannt. Seinen Untersuchungen zufolge besteht Propolis zu 60-85% aus Harzen, zu ca. 10% aus Zimtalkohol, zu ca. 4% aus Gerbstoffen und zu ca. 1% aus Zimtsäure.

Eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung von Propolis erschienen erst Mitte des 20. Jahrhunderts. Laut diesen Veröffentlichungen gehören zu den Hauptbestandteilen der Propolis pflanzliche Harze, ätherische Öle und Wachs,

wobei einige Autoren (KÜSTENMACHER (1911), KELLER et al. (1964) u.a.) auch Gerbstoffe fanden.

Ausgehend von den in der Fachliteratur der 50er bis 70er Jahre veröffentlichten Angaben läßt sich feststellen, daß die Zusammensetzung der Propolis in einzelnen Bestandteilen identisch ist, anteilmäßig aber großen Schwankungen unterliegt. So beträgt der Harzanteil nach unterschiedlichen Autorenangaben 50 bis 85%, der Anteil ätherischer Öle und anderer flüchtiger Stoffe 4,5 bis 15%, der Wachsanteil 12 bis 40%, der Gerbstoffanteil 4 bis 10,5%, der Anteil in Alkohol nichtlöslicher Stoffe und mechanischer Beimengungen 5 bis 15%. Der Anteil von Pollen am Gesamtgewicht der nichtlöslichen Stoffe und mechanischen Beimengungen liegt zwischen 5 und 11%, der Ascheanteil beträgt 18 bis 20%.

KIWALKINA (1964) berichtete über die Forschungsergebnisse von Karjakin und Nikolskaja, die Spektralanalysen von Propolis durchführten und folgende Elemente nachwies: Eisen, Kalium, Aluminium, Magnesium und Silicium, geringe Mengen von Kupfer, Mangan und Zink sowie in einigen Fällen Kobalt und Silber.

Im Pasteur-Institut in Paris isolierte VILLANUEVA (1964) aus Propolis Galangin (3,5,7 Trihydroxyflavon) und (1970) Pinocembrin (5,7 Dihydroxyflavanon).

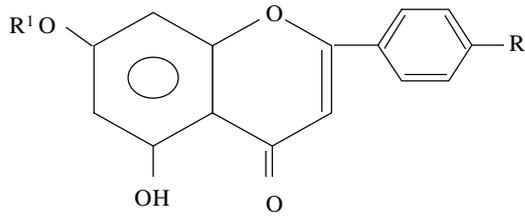
ČIŽMÁRIK et al. (1970) gelang es, Kaffeesäure aus Propolis zu isolieren und sie als 3,4 Dihydroxyzimtsäure zu identifizieren.

1972 wurde auf dem 1. Internationalen Symposium über Propolis in Bratislava bereits von 18 isolierten Verbindungen berichtet.

JANEŠ et al. (1974) isolierten in ihren Versuchen Benzoesäure, Sorbinsäure, Benzylalkohol, Phenylalkohol, Phenylvinylether, Anisylvinylether, Cydohexylbenzoat, Vanillin und Spuren eines unbekanntes Gemisches.

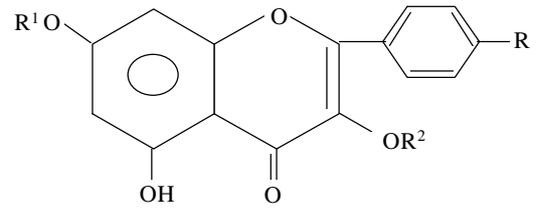
POPRAWKO (1975) isolierte 11 von 18 identifizierten Propolisbestandteilen, deren exakte chemische Struktur bekannt war. Der Autor ordnete die wichtigsten Propolisbestandteile dem Flavonoidtyp zu, hauptsächlich den Flavonen (1-4), den Flavonolen (5-10) und den Flavononen (11-13). Auch ein Terpen der Gruppe Carophylin  $\alpha$ -Acetoxy-Betulenol (15) und ein aromatisches Aldehyd, das Isovanillin (16), wurden identifiziert.

Nach POPRAWKO (1975)



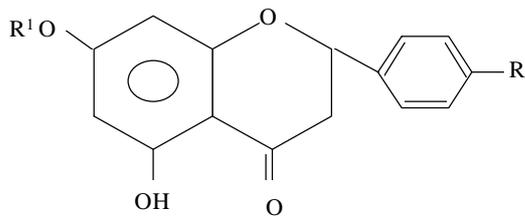
Flavone

- (1)  $R^1 = H, R = H$  (Chrysin)
- (2)  $R^2 = Me, R = H$  (Tektochrysin)
- (3)  $R^1 = H, R = OMe$
- (4)  $R^1 = Me, R = OMe$



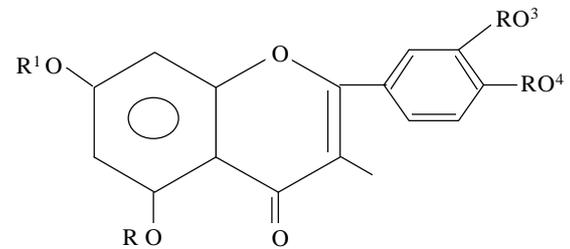
Flavonole

- (5)  $R = H, R^1 = R^2 = Me$  (Galangin)
- (6)  $R^1 = Me, R^1 = R^2 = H$  (Isalpinin)
- (7)  $R^1 = Me, R^2 = H, R = OMe$
- (8)  $R^1 = H, R^2 = Me, R = OMe$
- (9)  $R^1 = Me, R^2 = H, R = OH$  (Rannocytrin)
- (10)  $R^1 = H, R^2 = H, R = OMe$  (Kämpferid)



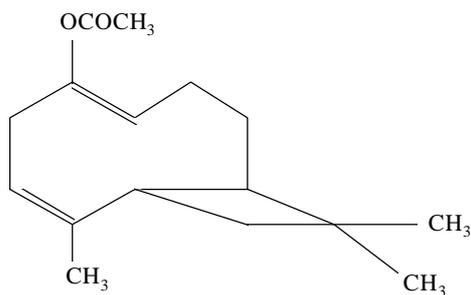
Flavanone

- (11)  $R^1 = H$  (Pinocembrin)
- (12)  $R^1 = Me, R = H$  (Pinostrobin)
- (13)  $R^1 = Me, R = OMe$

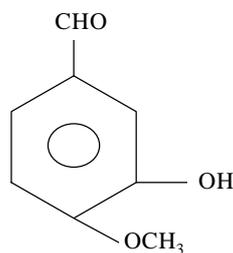


Quercetin-Derivate

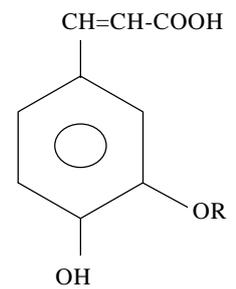
- (14)  $R^1 = R^5 = H$  oder Me



(15)  $\alpha$ -Acetoxy-Betulenol



(16) Isovanillin



(17)  $R = H$  Kaffeesäure  
(18)  $R = Me$  Eisensäure

Ein allgemeines Schema der chemischen Propolisanalyse wurde von POPRAWKO (1976b, 1976c) ausgearbeitet. Dieses Schema basiert auf den Methoden der Massenspektrometrie sowie der Gas- und Flüssigkeitschromatographie. Anhand dieses Schemas wurden nicht nur die wichtigsten Propolisbestandteile identifiziert, sondern die individuellen chemischen Kombinationen in der Propolis eingehend untersucht. Birkenpropolis setzte sich aus Kombinationen der 6 nachfolgend aufgeführten Bestandteile zusammen: p-Oxy- und p-Methoxybenzoesäure, 7-mono- und 4-p-Kumarinsäure, 7-Dimethylether des Naringeninflavons und  $\alpha$ -Acetoxylbetulenolsesquiterpen.

Der von POPRAWKO (1976) durchgeführte Vergleich der biologischen Wirkungen verschiedener Propolistypen und ihrer chemischen Zusammensetzung sprach für deren Einheitlichkeit, da sämtliche untersuchten Typen drei Hauptkombinationen enthielten: Terpene, aromatische Säuren und Flavonoide. Jede dieser Kombinationsgruppen bedingt seiner Meinung nach bestimmte biologische Wirkungen einer solchen komplexen Substanz wie Propolis.

METZNER et al. (1975, 1979, 1979a) und SCHNEIDEWIND et al. (1975, 1979) untersuchten ebenfalls die Inhaltsstoffe von Propolis. Sie identifizierten die bereits von anderen Autoren in Propolis nachgewiesenen Flavonoide und wiesen erstmalig Pectolinarginin, Quercetin-3, 3-Dimethylether, Sacuranetin, Pinobanksin und das von WOLLENWEBER et al. (1973) im Knospenöl zahlreicher Pappelarten gefundene Pinobanksin-3-acetat nach. Darüber hinaus fanden sie p-Chenarsäurebenzylester und noch zwei weitere Inhaltsstoffe, von denen einer als ein Gemisch von Kaffeesäureestern angesehen wurde. Insgesamt isolierten sie 25 Inhaltsstoffe, von denen 7 erstmals nachgewiesen wurden.

KELLER et al. (1964) berichteten darüber, daß Propolis eine Reihe von Vitaminen enthält: wie A, B1, B2, E, C, H und PP. Das Vorhandensein von Vitaminen in der Propolis ist auf ihren Gehalt an Pollen zurückzuführen. ALADYSCHKIN (1973) und VALI. (1983) teilten ebenfalls mit, daß in der Propolis eine Reihe von Vitaminen enthalten sind, insbesondere die Vitamine A, B und C.

Der Gesamtstickstoffgehalt in Propolis liegt nach KOMAROW (1993) unter 0,7% und ist vom Pollenanteil abhängig. Nachgewiesen wurden weiterhin 17 Aminosäuren.

WALKER et al. (1987) listeten insgesamt 149 in Propolis nachgewiesenen organischen Verbindungen auf: 38 Flavonoide, 24 Aminosäuren, 14 Zimtsäure- und Zimtalkoholderivate, 12 Alkohole, Phenole, Ketone und Heteroaromaten, 12 Benzoesäurederivate, 11 Sesquiterpene und Triterpene, 8 Säuren und Derivate, 7 Terpene, Sesquiterpenalkohole und

deren Derivate, 7 Zucker, 6 aliphatische Kohlenwasserstoffe, 6 Sterole und Steroide, 2 Benzaldehydderivate und 2 Chalkone.

Tropische Propolisproben aus Hawaii enthielten nach KÖNIG (1988) keine Flavonoide und Zimtsäurederivate, sondern eine Reihe von Kohlenwasserstoffen und "exotische" Substanzen noch unbekannter chemischer Natur. Diesem Autor gelang 1985 bei Untersuchungen von Propolisproben der Nachweis von Dikaffeeoylverbindungen.

Den Hauptanteil der in Australien gesammelten Propolis bildeten nach GHISALBERTI et al. (1978) Pterostilbene, Xanthorrhoeol, Sakuranetin und Pinostrobin.

Die Zusammensetzung der Propolis wurde von POPESCU et al. (1976) mit dem Ziel untersucht, die aktiven Substanzen zu identifizieren und ihre pharmakologische Aktivität nachzuweisen. Insbesondere ging es um die bis dahin noch nicht nachgewiesenen Enzyme. Der Nachweis von Enzymen, die über eine Veränderung der Energieebenen und eine Beschleunigung bestimmter Reaktionen wirken, trug wesentlich zur Identifizierung von pharmakodynamischen Wirkungen der Propolis bei.

Propolisbestandteile mit biologischer Aktivität wurden von MITRO (1996) zusammengefaßt und sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Biologische Aktivität einiger Propolisbestandteile (nach MITRO 1996)**

Propolisbestandteil	biologische Aktivität
Isovanillin	antibakteriell
Benzoessäure	antibakteriell
Pinobanksin	antibakteriell
Isoramnetin	spasmolytisch
Kaffeensäure	antibakteriell, fungistatisch, tuberkulostatisch
Ferulasäure	antibakteriell, adstringierend
Pinocembrin	fungistatisch
Pinostrobin	antibakteriell, analgetisch
Sakuranetin	angistatisch, antibakteriell
Apigenin	antibakteriell
Akacetin	antibakteriell
Galangin	antibakteriell
3,5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavon	antibakteriell
5,7-Dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavon	anticholeretisch, spasmolytisch
3,5,7-Trihydroxy-4',6'-dimethoxyflavon	antibakteriell
Sorbitol	antibakteriell, fungistatisch

Anhand der ausgewerteten Literatur wird deutlich, daß durch die in den letzten Jahren vervollkommneten Analyseverfahren auch in Spuren vorkommende Substanzen in der Propolis nachgewiesen werden konnten.

## 2.1.3 Pharmakologische Eigenschaften von Propolis

### 2.1.3.1 Antibakterielle Eigenschaften

Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität der Propolis wurden erstmals 1947 von KIWALKINA (1964) durchgeführt. Sie testete die inhibierende Wirkung von Nativpropolis, von Propolisalbe sowie von Hydro-, Alkohol-, Azeton- und Benzinpropolisextrakten. Es wurden in vitro 72 Stämme von 24 Bakterienarten mit veterinärmedizinischer Relevanz getestet und eine bakteriostatische sowie eine bakterizide Wirkung nachgewiesen. Die höchste Empfindlichkeit auf Nativpropolis zeigten *Pasteurella avium*, *Pasteurella cuniculi* und *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Von den getesteten Bakterienarten erwiesen sich die Sporenbildner *Bacillus anthrax* und *Bacillus pseudoanthracis* als resistent. Eine deutlich ausgeprägte bakterizide, einschließlich sporizide Wirkung zeigten die Extrakte aus Propolis mit Ethanol und Azeton, bei den Extrakten mit Wasser und Benzin zeigte sich keine sporizide Aktivität. Bei den durchgeführten Versuchen wurde die bakteriostatische Wirkung an Bakterienkulturen auf Nährmedien (Fleischpeptonbouillon und Fleischpeptonagar) untersucht. Dabei zeigten die grampositiven Erreger, insbesondere die Sporenbildner, eine hohe Sensibilität. Die getesteten gramnegativen Bakterien, ausgenommen *Pasteurella avium* und *Pasteurella cuniculi* sowie *Fusobacterium necrophorum*, zeigten dagegen eine geringe Empfindlichkeit. Es wurde ferner festgestellt, daß die Empfindlichkeit der Bakterien von der PropolisKonzentration im Nährmedium bzw. von der Einwirkungsdauer bestimmt war.

KARIMOWA (1960) untersuchte in vitro die biologische Wirkung der Wasseremulsion des Ethanolpropolisextraktes an 25 Stämmen pathogener Leptospiren und an 3 Stämmen von *Treponema pallidum*. Bei allen untersuchten Stämmen wurde eine bakterizide Wirkung der Propolis festgestellt.

ALEKSANDROW et al. (1974) untersuchte die Empfindlichkeit verschiedener Bakterienstämme, die von Pyodermiepatienten isoliert worden waren, auf die antibakterielle Wirkung von Propolis. Eine ausgeprägte bakterizide Wirksamkeit zeigten kommerzielle Propolispräparate auf *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus haemolyticus* und *Proteus vulgaris*, welche die der vergleichsweise getesteten Antibiotika (Penicillin, Ampicillin, Tetracyclin) übertraf.

ČIŽMÁRIK et al. (1976a) vermerkten, wie bereits Kiwalkina 1946, eine besonders hohe Wirksamkeit des mit 96%igem Ethanol hergestellten Propolisextraktes auf grampositive

Bakterien. Auf 35 Stämme von *Staphylococcus aureus* mit unterschiedlichem Resistenzgrad wirkte der Propolisextrakt verlässlich bakteriostatisch in 1%iger und bakterizid in 2%iger Lösung. Auf gramnegative Erreger war die antibakterielle Wirkung unterschiedlich stark ausgeprägt.

In einer von SCHELL et al. (1981) durchgeführten Untersuchung zur antibakteriellen Wirksamkeit des ethanolischen Propolisextraktes wurde die Empfindlichkeit von grampositiven Bakterien, virulenten Tuberkelbakterien und Protozoen bestätigt. Staphylokokken wiesen die höchste Empfindlichkeit unter den Bakterien auf. Gramnegative Bakterien, darunter *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, waren resistent.

METZNER et al. (1979, 1979a) bestätigten bei einer Untersuchung an *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* die antibakterielle Wirkung der Propolis und schrieben sie den Flavoniden Pinocembrin, Galangin, Pinobanksin, Pinobanksin-3-acetat, Sakuranetin sowie dem p-Cumarsäurebenzylester und einem Kaffeesäureestergemisch zu. Sie untersuchten diese aktiven Propolissubstanzen einzeln im Vergleich mit Streptomycin, Oxytetracyclin, Chloramphenicol und Sulfamerazin und stellten fest, daß keine der isolierten Substanzen an die Wirkung der Antibiotika heranreichte. Die MHK-Werte der einzelnen isolierten Substanzen lagen dabei über dem Wert des ethanolischen Propolisextraktes.

Damit wurde die Behauptung von VILLANUEVA et al. (1964, 1970) bestätigt, daß nur wenige Inhaltsstoffe von Propolis eine antibakterielle Aktivität aufweisen. Sie hielten Galangin und Pinocembrin für deutlich antibakteriell wirksame Inhaltsstoffe, während andere Flavonoide (Chrysin, Tektochrysin, Isalpinin u.a.) als weniger wirksam oder unwirksam eingeschätzt wurden.

PEPELNJAK et al. (1982) prüften die antibakterielle Aktivität einzelner Bestandteile der Propolis. Die Untersuchungen der Zusammensetzung der ethanolischen Extrakte von 31 Propolisarten zeigten, daß sie sich vor allem durch die Menge der identifizierten Inhaltsstoffe und nicht durch die Art derselben unterschieden. Die inhibierende Wirkung auf *Bacillus subtilis* war bei gleicher Dosierung bei allen Propolisarten verschieden. Für die antibakterielle Wirksamkeit der jeweiligen Propolisarten sei der Galangingehalt von entscheidender Bedeutung, meinten die Autoren. Im Vergleich zu Antibiotika war eine relativ hohe Propoliskonzentration notwendig, um eine antibakterielle Wirkung zu erreichen.

SCHELLER et al. (1977b) beschäftigten sich ebenfalls mit der Klärung der antibakteriellen Wirkung der Propolis. Sie hielten Galangin und Pinocembrin für die zweifellos antibakteriell

wirksamen Inhaltsstoffe, während andere Flavonoide weniger oder nicht wirksam waren, aber in Kombination Wirksamkeit zeigten.

Die von verschiedenen Autoren im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen unter Anwendung gleicher Methodik (Verdünnungsreihe) ermittelten MHK-Werte von Propolis für ausgewählte Erreger sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

**Tabelle 2: MHK-Werte der Propolis für ausgewählte bakteriologische Erreger in mg/ml Nährboden**

Autor	Bakterienstämme		
	Staphylococcus aureus	E. coli	Pseudomonas aeruginosa
MERESTA et al. (1985)	35 Stämme (0,09-0,12)	Stamm 353 (2,6) Stamm 354 (2,6)	(6,8)
ČIŽMÁRIK et al. (1976)	35 Stämme (0,75-1,5)	über (7,5)	(6-7,5)
SERRA et al. (1995)	(0,6-0,8)	(6-8)	nicht ermittelt
GLIŃSKI et al. (1987)	Stamm 209 P (0,12)	nicht ermittelt	nicht ermittelt
NERSESJAN (1989)	Stamm 209 (0,03-2,5)	nicht ermittelt	nicht ermittelt
METZNER et al. (1979a)	(1,5)	nicht ermittelt	nicht ermittelt
MAKROSJAN et al. (1990)	(0,07-2,5)	nicht ermittelt	nicht ermittelt
BEKEMEIER et al. (1972)	(1,25-2,5)	nicht ermittelt	nicht ermittelt

KUJUMGIEW et al. (1993) untersuchten im Agardiffusionstest die antibakterielle Aktivität von bulgarischer Propolis im Vergleich zu Knospenharzen verschiedener Pappelarten. Bei *Staphylococcus aureus* 209 zeigte sich eine Übereinstimmung der antibakteriellen Aktivität von Propolis und dem Knospenharz von *Populus nigra*. Knospenharz von *Populus italica* zeigten eine etwas schwächere antibakterielle Wirkung.

TAKAISI-KIKUNI et al. (1994) führten elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Aufklärung des antibakteriellen Wirkungsmechanismus von Propolis auf *Streptococcus agalactiae* durch. Sie konnten nachweisen, daß die antibakterielle Wirkung von Propolis durch eine Hemmung der Proteinsynthese und Teilungsvorgängen sowie durch eine Auflösung des Zytoplasmas, der Zytoplasmamembran und der Zellwand bedingt war. Die Autoren stellten somit fest, daß Propolis offenbar einen komplexen Wirkungsmechanismus besitzt, daß heißt nicht wie die klassischen Antibiotika über einen spezifischen Angriff ihre Wirkung entfaltet.

Als eine markante Ergänzung zur bakteriostatischen und bakteriziden Wirkung weist die Propolis eine weitere wichtige Eigenschaft auf, durch die sich Propolis von Antibiotika positiv unterscheidet. Nach Mitteilung von KIWALKINA (1964b) zeigen Bakterien gegen die Propolis



Trichophytia profunda	2	2	2	-	-
-----------------------	---	---	---	---	---

Die antimykotische Aktivität der Propolis wurde von zahlreichen Autoren BEKEMEIER et al. (1972), IALOMITEANU (1976), ČIŽMÁRIK et al. (1975, 1976), MONACHOWA (1976), METZNER et al. (1977), METZNER et al. (1979), PEPELNJAK et al. (1982), VERZÁR et al. (1983), MERESTA et al. (1985) auf verschiedene Stämme von Hefen und Pilzen untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, daß Propolis eine relativ hohe Effektivität gegen ein breites Spektrum mykologischer Erreger besitzt, darunter die klinisch bedeutsame Hefe *Candida albicans* (Tabelle 4).

**Tabelle 4: MHK-Werte der Propolis für einige mykologische Erreger in mg/ml Nährboden**

Autor	mykologische Erreger	Minimale hemmende Konzentration (MHK) mg/ml
METZNER et al. (1977)	<b>Candida albicans 533/74</b> Candida clausenii 299/67 Candida tropicalis H Candida parapsilosis 1156/65 Candida krusei 490/69 Candida catenulata H11 Candida brumpti 9a Candida solani 11/69 Candida utilis 857/67 Candida melibiosi 1362/66 Candida friderichii R 64a	<b>3,0</b> 3,0 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10
ČIŽMÁRIK et al. (1976)	Trichophyton sp. 8 Stämme Trichophyton verrucosum 6 Stämme Trichophyton rubrum 7 Stämme <b>Candida albicans 14 Stämme</b> Torulopsis sp. 15 Stämme Trichosporon infestans 3 Stämme Microsporion sp. 5 Stämme Candida sp. 28 Stämme Trichophyton mentagrophytes 9 Stämme	(0,15-2,25) (0,15-0,375) (0,15-0,75) <b>(0,375-0,75)</b> (0,375-0,75) (0,375-0,75) (0,375-1,5) (0,375-1,5) (0,375-2,25)
IALOMITEANU et al. (1976)	<b>Candida albicans 4 Stämme</b> Gladosporium	<b>10*</b> 10*
METZNER et al. (1979)	Trichophyton mentagrophytes <b>Candida albicans</b>	0,188 <b>3,0</b>
BEKEMEIER et al. (1972)	<b>Candida albicans</b>	<b>2,5</b>
MERESTA et al. (1985)	<b>Candida albicans</b>	<b>0,8</b>

\* <10 mg/ml nicht getestet

### 2.1.3.3 Antivirale Eigenschaften

Neben den seit Anfang der 50er Jahre bekannten antimikrobiellen und antimykotischen Wirkungen der Propolis wurde seit Mitte der 70er Jahre wiederholt über deren antivirale Eigenschaften berichtet. Die positiven Ergebnisse, die Autoren wie BOJNAŇSKÝ et al. (1975) bei Untersuchungen der inhibierenden Wirkung von Propolisextrakten auf experimentell mit Pflanzenviren Gurkenmosaik, Wildfeuer, Tabaknekrose hervorgerufenen Erkrankungen feststellten, haben nachfolgend auch Untersuchungen auf mensch- und tierpathogenen Viren ausgelöst.

JUCU et al. (1976) berichteten auf dem 2. Internationalen Apitherapie-Symposium über die antivirale Wirkung von Propolis bei experimentell viralen Infektionen bei Mäusen. Mit dem Grippevirus APR8 (10 LD<sub>50</sub>) infizierte und 24 Stunden später über 2 Tage intraperitoneal mit Propolisextrakt behandelte Mäuse wiesen eine relevant höhere Überlebensrate auf als die nicht behandelten Kontrolltiere. Die antivirale Propoliswirkung wurde durch weitere experimentelle Untersuchungen bestätigt. CRIȘAN et al. (1976) testeten die Wirkung von Propolisextrakten in vitro auf das Herpes simplex Virus. Verwendet wurde der Stamm VR 3 Virus Herpes simplex (VHS) Typ 1. In den Versuchen wurde die Propolis in abgestuften Konzentrationen unter 1% angewendet. Die erzielten Ergebnisse zeigten eine signifikante antivirale Wirkung des Propolisextraktes auf das VHS in vitro. Nach Austausch der propolishaltigen Nährmedien gegen Nährmedien ohne Propoliszusatz nahm die Vermehrung des VHS allmählich wieder zu.

Auch AMOROS et al. (1992) untersuchten den antiviralen Effekt von Propolisextrakten und ihrer Hauptinhaltsstoffe auf das Herpes Simplex Virus Typ 1. Sie ermittelten folgende Reihenfolge hinsichtlich der Virenwirksamkeit: Galangin, Kaempferol und Quercetin. Der Propolisgesamtextrakt wies stärkere antivirale Eigenschaften auf als die einzelnen Bestandteile.

Ergebnisse von KALETA (1991) zeigten eine Hemmwirkung auf eine Klein- und eine Groß-Plaque-Variante des Tauben Herpesvirus in vitro.

BANKOVA et al. (1988, 1995) bestätigten die antivirale Wirkung von Propolisextrakten auf verschiedene Herpesviren.

KÖNIG et al. (1985, 1988) stellten ebenfalls Hemmeffekte von Propolis auf verschiedene vogel- und säugerpathogene Herpesviren fest, wobei die Autoren die antivirale Aktivität der Propolis in Quercetinderivaten, Luteolin, Kaffeesäure und Dikaffeeoylverbindungen sahen und einen additiven Effekt von anderen Inhaltsstoffen nicht ausschlossen. Nach Meinung der

Autoren soll der Hemmechanismus von Propolis auf Viren im Bereich der Protein- oder Nukleinsäuresynthese zu suchen sein.

Erfolgreiche Behandlungen von 60 Patienten mit rezidivierender Haut- und Genitalherpes führten CIURCĂNEANU et al. (1983) durch. In 85% der Fälle wurde eine Verkürzung der Krankheitsdauer sowie eine Verminderung der Schmerzen festgestellt.

KOLESNIKOWA (1993) verwendete Propoliswasserauszüge in der humanmedizinischen Ophthalmologie bei der Therapie von herpesvirusbedingten Keratitiden. Zusammenfassend stellte die Autorin fest, daß Propolispräparate eine schnellere Epithelisierung hervorriefen, die Prozesse der Regeneration beschleunigten, den Behandlungszeitraum verkürzten sowie eine bedeutende Erhöhung der vollständigen funktionalen Heilung bewirkten.

#### **2.1.3.4 Unterstützende Wirkung auf immunologische Faktoren**

Eine Wirkung der Propolis auf immunologische Faktoren wurde anhand von Untersuchungen in vivo und in vitro von verschiedenen Autoren nachgewiesen.

ALEKSANDROW et al. (1974) stellten bei mit pathogenen Streptokokken-Spezies peritoneal infizierten Mäusen, die zeitgleich ebenfalls 2 mg einer 2%igen Propolislösung appliziert bekamen, im Peritonealexsudat eine auf das doppelte erhöhte Phagozytenanzahl im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen fest. Versuche von KIWALKINA et al. (1988) an Kaninchen zeigten, daß die orale Verabreichung von Propolisemulsion eine Steigerung immunologischer Faktoren bewirkte: sowohl der unspezifischen (Komplementbindung, Phagozytenanzahl, Properidingehalt) als auch der spezifischen (Antikörperbildung). Diese Ergebnisse veranlaßten eine weitere Untersuchung über die unspezifische Wirkung von Propolis in der Immunogenese, wobei Propolis gemeinsam mit einem Antigen verabreicht wurde. Getestet wurde korpuskuläres und nichtkorpuskuläres Salmonellenantigen sowie Tetanusantoxin. Als Versuchstiere wurden Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Kälber verwendet. Bei diesen Versuchen wurde festgestellt, daß die Propolis, gemeinsam mit dem Antigen appliziert, die immunologischen Vorgänge anregt. Es kam zu einer intensiveren Reaktion in den Organen mit lymphoider Struktur, hauptsächlich in den regionalen Lymphknoten. Dies äußerte sich in einer Vergrößerung des lymphatischen Gewebes und in der intensiven Bildung von immunkompetenten Zellen. In diesem Fall war ein Anstieg der Komplementbindung des Bluteserums, der Phagozytenaktivität, der Gammaglobulin- und spezifischen Antikörpersynthese (Agglutinin, Preapitin, Antitoxin) zu verzeichnen. Die Hyperimmunseren,

die bei Mäusen nach gleichzeitiger Verabreichung von Propolis und Salmonellenantigen bzw. Tetanusantigen gewonnen wurden, besaßen eine stärkere protektive Wirkung.

Diese Ergebnisse zeigten die Möglichkeit auf, Propolis als Adjuvans für Impfstoffe und Seren zu verwenden. Die unterstützende Eigenschaft der Propolis wurde im Vergleich zur Freundschenschen Adjuvans geprüft. Hierbei zeigte sich eine bessere Wirkung von Propolisextrakt, außerdem wurden keine allergischen Reaktionen beobachtet.

Das Ausbleiben einer Antikörperbildung nach Applikation von ethanolischen Propolisextrakt wurde von SCHELLER et al. (1977a) beschrieben. Die Autoren verabreichten Kaninchen parenteral Propolisextrakte. Dabei stellten sie fest, daß die verabreichte Propolisextraktmenge einen entscheidenden Einfluß auf die Anregung immunologischer Vorgänge hatte. In einer Versuchsreihe, durchgeführt von MANNAPOWA et al. (1988), wurde 3,5 bis 4 Monate alten Kaninchen subkutan jeweils 1 ml Antigen aus einer 24-Stunden-Kultur von *Salmonella enteritidis* (Stamm 1204) mit Propolisextraktzusatz appliziert. Die Anzahl von Salmonellen pro ml Antigen betrug 4 Mrd., die verabreichte Propolismenge in verschiedenen Tiergruppen 5 mg, 10 mg, 20 mg und 50 mg Trockensubstanz pro 1 ml Antigen. Die Ergebnisse zeigten, daß eine Dosis von 5 mg Propoliskrockensubstanz in 1 ml *Salmonella*-Antigen am wirksamsten war. Dabei wurden bei den Kaninchen sowohl Faktoren der unspezifischen Immunität (Komplement) als auch die der spezifischen Immunität (Bildung von Gammaglobulinen und Antikörpern) angeregt. Die Dosen von 10 und 20 mg/ml verstärkten nur unwesentlich die Immunreaktion. Eine Verabreichung von 50 mg erwies sich als nachteilig, da sie zur Unterdrückung der Immunantwort führte, was sich in einer starken Senkung des B-Lymphozytengehaltes, in einer merklichen Reduktion der T-Lymphozytenanzahl und der Verminderung der komplementären Aktivität des Blutserums zeigte. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß die Anwendung von Propolis als Adjuvans für jede Indikation (Tierart + Erreger) abgeklärt werden muß, um negative Auswirkungen zu vermeiden.

In diesem Zusammenhang lassen sich die Ergebnisse von PALMBACHA (1970) deuten. Dieser Autor stellte fest, daß eine Verabreichung per os von Propolisemulsion keine Erhöhung des Antikörpertiters auf *E. coli* und *S. enteritidis* induzierte. Desweiteren wurde keine signifikante Erhöhung der Komplementbindungsaktivität des Blutserums ermittelt. Die orale und parenterale Verabreichung von wässrigen Propolisauszügen an Mäuse durch DIMOV et al. (1991) erhöhte die Überlebensrate und Überlebenszeit der Tiere nach deren Infektion mit

*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. In vitro stimulierte der Propolisauszug in Zellkulturen von Peritonealmakrophagen die Produktion von Interleukin 1.

Eine Steigerung der Lymphozytenproliferation und eine deutliche Erhöhung der IgM-Titer in den Überständen von Zellkulturen wurde von NEUNABER (1995) bei bestimmten Propoliskonzentrationen im Nährmedium erreicht.

Untersuchungsergebnisse über die immunmodulierende Wirkung von Propolis nach einer experimentellen Infektion bei Meerschweinchen mit *Ascaris suum* wurden von BENKOVA et al. (1989) publiziert. Hierbei bewirkten Präparate, die zusätzlich zur Propolis chemische Immunstimulatoren enthielten, eine signifikant höhere Anzahl von B- und T-Zellen in den lymphoiden Organen als ein nur aus Propolis bestehendes Präparat. Die protektive Wirkung des nur aus Propolis bestehenden Präparates, gemessen an der Anzahl migrierender Larven in die Lunge, war im Vergleich zu den Kombinationspräparaten niedriger.

#### **2.1.3.5 Antiparasitäre Eigenschaften**

Eine therapeutische Wirkung mit alkoholischem Propolisextrakt bei Infektionen mit *Trichomonas vaginalis* (allein oder als Mischinfektion mit *Candida* sp.) wurde von IALOMITEANU et al. (1976) erzielt.

Die Wirkung von alkoholischen Propolisextrakt gegen *Paramecium* ab einer Konzentration von 8mg/ml Nährmedium wurde von WAHONINA et al. (1976) beschrieben.

STARZYK et al. (1977) beschrieben die antiparasitäre Wirkung eines Ethanolextraktes von Propolis auf *Trichomonas vaginalis* in vitro. Eine antiparasitäre Wirkung auf *Toxoplasma gondii* wurde von ihnen nach 24stündiger Einwirkzeit dieses Extraktes erzielt.

Ethanol- und Dimethylsulfoxidextrakte von Propolis erwiesen sich in vitro nach HIGASHI et al. (1994) wirksam gegen verschiedene Stadien von *Trypanosoma cruzi*. Eine vollständige Lysis der trypomastigoten Formen im Blut wurde 24 h nach Anwendung von Ethanolpropolisextrakten erreicht. Die orale Verabreichung von Propolisextrakten bis zu 5 g/kg täglich an mit *Trypanosoma cruzi* infizierte Mäuse zeigte jedoch keine Wirkung, wie CASTRO et al. (1995) berichteten.

### **2.1.3.6 Sonstige pharmakologische Eigenschaften**

Propolis besitzt aufgrund ihrer zahlreichen Bestandteile eine Vielzahl weiterer pharmakologischer Eigenschaften, über die interessante Untersuchungsergebnisse vorliegen. Nachfolgend werden pharmakologische Wirkungen der Propolis angeführt, deren weitere Untersuchung auch für veterinärmedizinische Indikationen von Interesse wäre.

#### **Lokalanästhetische Wirkungen**

Nach DOROSCHENKO (1988) soll die lokalanästhetische Wirkung von Propolis 3,5mal stärker als die des Kokains und 5,2mal stärker als die des Novocains sein.

Ausführliche Untersuchungen zur lokalanästhetischen Wirkung der Propolis wurden von TZAKOFF (1975) an 12 Schafen und 3 Hunden durchgeführt. Der Autor testete die lokalanästhetische Wirkung einer Propolisemulsion sowie eines Propoliswasserauszuges nach einer Infiltrationsanästhesie. Als Vergleich diente eine 5%ige Novocainlösung mit gleichem Volumen. Der Autor stellte fest, daß die lokalanästhetische Wirkung durch die Propolisemulsion der einer 5%igen Novocainlösung entsprach.

Die lokalanästhetische Wirkung der Propolis sowie einiger ihrer Inhaltsstoffe wurde von PAINTZ et al. (1979) an der Kaninchen- und Mäusecornea getestet. Eine vollständige Anästhesie wurde mit dem 10%igen Propolisgesamtextrakt sowie mit den Propolisinhaltsstoffen Pinoembrin, Pinostrobin und einem Kaffeesäureestergemisch erreicht, wobei diese Reinsubstanzen dreimal stärker wirkten als der Propolisgesamtextrakt. Mit Pinoembrin und einem Kaffeesäureestergemisch konnte bei s.c. Applikation eine dem Lidocain entsprechende lokalanästhetische Wirkung erreicht werden.

#### **Antiphlogistische Wirkungen**

Die antiphlogistischen Eigenschaften der Propolis sind bei der Wundbehandlung mit Propoliszubereitungen von einigen Autoren beschrieben worden. Aber auch in experimentellen Untersuchungen an standardisierten Entzündungsmodellen wurde die antiphlogistische Wirkung der Propolis nachgewiesen.

DOBROWOLSKI et al. (1991) berichteten über die entzündungshemmenden Wirkungen von Propolisextrakten in akuten und chronischen Entzündungsmodellen. Mit oral verabreichten Propoliswasserauszügen bewirkten KHAYYAL et al. (1993) einen entzündungshemmenden Effekt am Rattenpfoten-Karageenödem-Modell und an adjuvanzinduzierter Arthritis bei Ratten, der vergleichbar war mit der Wirkung von Diclofenac.

### **Regenerationsfördernde Wirkungen**

Die regenerationsfördernde Wirkung der Propolis auf verschiedene Gewebearten wurde unter experimentellen Bedingungen von einigen Autoren untersucht.

Eine Beschleunigung der Regenerationsprozesse durch ethanolischen Propolisextrakt bei experimentell chirurgisch verursachten Knorpelverlusten wurden von SCHELLER et al. (1977c) festgestellt. Ethanolischer Propolisextrakt beschleunigte nach SCHELLER et al. (1978) ebenfalls die Regenerationsprozesse der Zahnpulpa bei deren experimenteller Schädigung.

Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Ethanolpropolisextrakt auf die Regeneration des Knochengewebes beschrieben STOJKO et al. (1978). Hierbei zeigte sich bei mit ethanolischen Propolisextrakt behandelten Patienten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe fast um die Hälfte verkürzte Zeit der vollständigen Ossifikation.

Bei Kaninchenversuchen stellten RODE et al. (1983) fest, daß mit Propolisextrakt behandelte Wunden mehr Fibroblasten und ein vermehrtes Wachstum von Kapillargefäßen zeigten als unbehandelten Wunden der Kontrolltiere.

### **Zytostatische Wirkungen**

Wie Untersuchungen aus jüngster Zeit zeigen, besitzt Propolis eine ausgeprägte zytostatische Wirkung auf Zelllinien.

Eine zytostatische Wirksamkeit in vitro verschiedener Propolisextrakte auf menschliche HeLa- und KB-Zellen wurde von HLADOŇ et al. (1980) nachgewiesen.

Bei Untersuchungen von ARAI et al. (1994) wurde eine Wachstumsinhibition der permanenten Zelllinie Murine Colon 26 in den Konzentrationen von 0,03-1,0 mg Propolis/ml festgestellt. Mäuse, die vor der Übertragung von Tumorzellen drei i.v. Injektionen von Propolis (0,1-0,4 mg/Maus) verabreicht bekamen, besaßen weniger Lungenmetastasen als die Kontrolltiere.

### 2.1.3.7 Nebenwirkungen und Toxizität

#### Nebenwirkungen

Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, besitzt Propolis nicht nur positive Wirkungen, sondern unter bestimmten Bedingungen auch Nebenwirkungen. So wurde von allergischen Reaktionen nach lokaler Anwendung propolishaltiger Zubereitungen berichtet.

Nach ARTAMASOWA (1974) können gelegentlich allergische Reaktionen nach Propoliskontakt bei Personen auftreten, die allgemein Allergiker sind bzw. auf Bienenstiche allergisch reagieren.

Eine Anzahl von Autoren berichtete über vereinzelte Fälle von Kontaktdermatitiden durch Propolis: GRZYWA et al. (1979), KOKELJ et al. (1983), MONTI et al. (1983), MACHACKOVA (1985), ESSER (1986), YOUNG (1987), CIRASINO et al. (1987), TREVISAN et al. (1987), KLEINHANS (1987), ANGELINI et al. (1987).

Nach HAUSEN et al. (1987) sind seit 1915 in der Weltliteratur annähernd 200 Fälle von allergischen Kontaktdermatitiden auf Propolis und Pappelknospenharz registriert. 25% dieser Fälle betrafen Imker. Die übrigen Fälle wurden durch Anwendungen propolis- und pappelknospenharzhaltiger Biokosmetika sowie durch die Nutzung der Propolis- und Pappelknospenzubereitungen bei der Selbstbehandlung hervorgerufen. Die Verfasser (1987a) wiesen im Meerschweinchenversuch nach, daß der 1,1-Dimethylallyl-Kaffeesäureester (LB-1), welcher in Pappelknospenharz und in Propolis enthalten ist, das Hauptallergen bei Allergien auf diese Stoffe darstellt. HASHIMOTO et al. (1988) isolierten aus Propolis und Pappelknospenharz zwei identische allergene Bestandteile. HEGYI et al. (1990) teilen nicht ohne Vorbehalt die Anschauung von HAUSEN et al. (1987a) und verwiesen auf mehrere Propolisallergene, deren Gehalt in der Propolis von der Pflanzenart, vom Ort und Zeit des Sammelns durch die Bienen bestimmt wird. Sie ermittelten an 1558 gesunden Personen eine Propoliskontaktallergie-Prävalenz von 0,64%.

Bei klinischen Untersuchungen an 1100 Patienten wurde von SCHELLER et al. (1981) in 0,25% der Fälle eine Allergie auf Propolis festgestellt, wobei häufiger Personen mit allgemeiner Allergieneigung betroffen waren.

TOSTI et al. (1985) berichteten über eine an 612 Patienten durchgeführte allergische Hauttestung mit einer 10%igen Propolislösung. Hierbei zeigten 6 Patienten eine positive Reaktion auf Propolis. MACHACKOVA (1988) stellte bei an 605 Patienten durchgeführten Hauttestungen mit einer 10%igen Propolisalkohollösung eine allergische Reaktion bei 25 Patienten (4,2%) fest. Eine Prävalenz von 0,9% bei 1365 Personen wurde von DOROSCHENKO (1988) ermittelt.

SCHULER und FROSCHE (1988) berichteten über eine Kontaktdermatitis auf Propolis bei Personen, deren Sensibilisierung durch Tätigkeit in der Imkerei oder durch die Anwendung von propolisshaltigen Zubereitungen hervorgerufen wurde. Diese Autoren führten Epikutantests durch, bei denen der in Propolis und Pappelknospenharz vorkommende 1.1-Dimethylallyl-3, 4-dihydroxyzimtsäureester das Hauptallergen darstellte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß während langjähriger experimenteller und klinischer Propolis Anwendung in der Humanmedizin keine unmittelbaren, dosisabhängigen Nebenwirkungen auf den Organismus bekannt wurden. Die Ausnahme bilden einige individuelle Unverträglichkeiten bei erhöhter Propolis Sensibilität. Bemerkenswert ist die von allen Autoren ermittelte niedrige Prävalenz der Propolis Kontaktdermatitiden.

### **Toxizität**

BEKEMEIER et al. (1972) führten Versuche zur Bestimmung der akuten und subakuten Toxizität von Propolis durch und fanden, daß Dosen bis 8,0 g/kg von weißen Mäusen symptomlos vertragen wurden.

Zur Untersuchung der Toxizität von Propolis verwendete KIWALKINA (1964b) native Propolis sowie verschiedene Propolis Zubereitungen: Ethanolpropolisextrakt in Wasser und Propolis in Milch. Anhand der an Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen durchgeführten Versuche wurde festgestellt, daß die Propolis keine toxische Wirkung besitzt. Die orale Verabreichung von Propolis (hydroalkoholische Emulsion) hatte keine Auswirkungen auf innere Organe. Die quantitative Zusammensetzung der Darmmikroflora wurde nicht beeinflusst und führte nicht zu einer Dysbakterie.

Eine "vollkommene Atoxizität" der verabreichten Propolispräparate wurde in einer zielgerichtet angelegten toxikologischen Untersuchung von KORCSOG et al. (1983) durch Blut- und histologische Untersuchungen bewiesen.

Subakute Toxizitätsprüfungen der Propolis führten METZNER et al. (1976) an der Maus und der Ratte durch. Den Mäusen wurde täglich über vier Wochen peroral an Stärke adsorbierte

Propolis in 1%iger Hydroxyethylzelluloselösung appliziert. Die Menge Propolis/kg Maus entsprach 5,26 g, 2,63 g und 1,32 g. Während des Versuches verhielten sich die Tiere unauffällig. Zwischen den Erythrozyten- und Leukozytenzahlen der Tiere der Versuchs- und Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Sektion der Versuchstiere ergab keine pathologischen Befunde. Bei den vier Wochen dauernden subakuten Toxizitätsprüfungen an der Ratte stellten die Autoren fest, daß eine tägliche Propolisgabe in Dosen zu 0,25 bzw. 1 g/kg täglich keine toxischen Symptome an ausgewachsenen Ratten hervorrief. Eine Vergrößerung der Nebennieren der Tiere in den Versuchsgruppen (Massenzunahmen von 15 und 20% im Vergleich zur Kontrollgruppe) wurde als Resultat der Stresssituation, bedingt durch die Applikation, erklärt. Diese Autoren führten desweiteren eine chronische Toxizitätsprüfung an Ratten durch, wobei einer Anzahl der Tiere sechs Monate lang täglich etwa 0,5 g Propolis/kg oral appliziert wurden. Bei dieser Gruppe konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Eine andere Gruppe erhielt über denselben Zeitraum täglich 4-5 g Propolis/kg. Bei dieser Dosierung traten Körpermasseverluste sowie eine Zunahme der Nebennierenmassen auf. Im Verlaufe des chronischen Toxizitätsversuches wurden hämatologische Parameter erfaßt, deren Auswertung die Unschädlichkeit von Propolis auf das hämatopoetische System ergab. Eine vierwöchige Kontrolle der Blutglukose ergab keine pathologischen Befunde. Zusammenfassend stellten die Autoren fest, daß Propolis in täglichen Dosen bis zu 1 g/kg oral „sicher praktisch atoxisch“ ist.

ARVOUET-GRAND et al. (1993) untersuchten die Toxizität von Propolis an Mäusen und ermittelten, daß die LD 50 größer als 7,35 g Propolisextrakt/kg war, so daß Propolis als atoxisch einzustufen sei.

Proben brasilianischer und chinesischer Propolis wurden von KANEEDA et al. (1994) auf ihre Toxizität an 5 Wochen alten Mäusen getestet. Über einen Zeitraum von 14 Tagen erhielten die Tiere tägliche orale Gaben von 2,23-4,0 g Propolis/kg. Bei der anschließenden Sektion der Tiere wurden keine pathologischen Veränderungen beobachtet.

DEREVICI et al. (1975) untersuchten Propolis auf Onkogenität, dabei wurde eine Emulsion aus Alkoholpropolisextrakt und destilliertem Wasser verwendet. Diese Emulsion wurde 24-28 Stunden alten Hamstern der Art *Cricetus auretus* in Dosen von 0,1 ml subkutan im interscapulären Bereich injiziert. Im Verlauf von sechs Monaten zeigten die Tiere keinerlei Krankheitssymptome. Eine Sektion nach sechs Monaten ergab keinerlei pathologische Veränderungen.

### **2.1.4 Ergebnisse der Propolis-anwendung in der Veterinärmedizin**

Während der Literaturrecherche wurde deutlich, daß im Gegensatz zur altbekannten und dokumentierten Anwendung der Propolis in der Humanmedizin deren Anwendung in der Veterinärmedizin erst in der Literatur der letzten 50 Jahren unseres Jahrhunderts beschrieben ist. Eine therapeutische Anwendung findet Propolis in erster Linie in der Veterinärmedizin des osteuropäischen Raumes. Veröffentlichungen aus den 80er und 90er Jahren deuten darauf hin, daß die Propolis zunehmend in der Veterinärmedizin Süd- und Lateinamerikas verwendet wird.

Eine Empfehlung des Ministeriums für Landwirtschaft der UdSSR, erarbeitet vom Kazaner Veterinärmedizinischen Institut (SELHOSISDAT 1962), zum Einsatz von Propolis in der Veterinärmedizin führt folgende Anwendungsgebiete auf: Wundbehandlung, Nekrobazillosetherapie, Behandlung von Jungtierdurchfällen, Therapie von Erkrankungen der Atemwegsorgane. KIWALKINA et al. (1985) empfahlen, Propolispräparate in der Veterinärmedizin zur Behandlung von Verbrennungen, Erfrierungen, infizierten Wunden, Dermatitisen, Furunkulosen, eitrig-nekrotischen Prozessen der Gliedmaßen sowie bei Krankheiten der Geschlechtsorgane einzusetzen. Ethanolischer Propolisextrakt in Wasser wurde zur Prophylaxe und Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen sowie bei Erkrankungen des Respirationstraktes von Kälbern und Ferkeln vorgeschlagen.

Die nachfolgende Auflistung gibt einen Überblick über Veröffentlichungen, in denen veterinärmedizinische Propolis-anwendungen beschrieben bzw. deren Wirkungen untersucht wurden.

#### **Anwendung bei Nekrobazillose und anderen Huf- und Klauenerkrankungen**

Propolissalbe aus nativer Propolis wurde erstmalig nach KIWALKINA et al. (1957) von Werestschagin 1948 zur Behandlung von experimenteller Nekrobazillose bei Schafen erprobt, wobei eine hohe Effektivität der verwendeten Salbe nachgewiesen wurde.

GAPTRACHIMANOWA (1954) verwendete versuchsweise propolishaltige Zubereitungen bei der Therapie von Nekrobazillose an Klauen und Hufen bei insgesamt 1889 Tieren (Schafe, Rinder, Pferde) und konnte im Vergleich zu anderen Arzneimitteln (Kupfervitriol, Formalin, Kaliumpermanganat, Birkenteer, Jodoformsalbe) eine wesentlich höhere Wirksamkeit bei der eingesetzten Propolissalbe feststellen. In 83,7 % der Fälle konnte eine Heilung erzielt werden.

Von IDRISOWA (1964) wurden 2400 an Nekrobazillose der Klauen und Hufe erkrankte landwirtschaftliche Nutztiere (Schafe, Rinder, Pferde) mit Propolissalbe behandelt. Nach

Reinigung der Wundflächen wurde auf die betroffenen Stellen eine dünne Schicht von Propolissalbe aufgetragen. In einigen Fällen wurde zusätzlich ein mit Propolisextrakt getränktes Tampon unter Verband gelegt. Dieser Verband wurde alle 2-7 Tage gewechselt. Die Tiere der Kontrollgruppen wurden mit Kaliumpermanganat, Birkenteer, Formalin, Kupfervitriol und Jodoform behandelt. Bei der Therapie mit Propolissalbe wurde eine Verminderung der entzündlichen Reaktion und der Schmerzhaftigkeit der betroffenen Hautteile erreicht. Die Salbe bewirkte nach 1-2maliger Applikation eine Abstoßung von nekrotischem Gewebe und nachfolgend die Bildung von Granulationsgewebe. Die Propolissalbe besaß im Vergleich zu den anderen Präparaten den höchsten therapeutischen Effekt.

ABDULLIN et al. (1954) behandelten 30 an Nekrobazillose erkrankte Rinder mit Propolissalbe. Die Tiere zeigten folgendes klinisches Bild: starke Lahmheit, eine ulzeröse Veränderung der Haut im Zwischenklauenspalt, am Kronsaum und der Klauenlederhaut. Die Autoren applizierten täglich mittels einer Spritze erwärmte Propolissalbe in die Fistelöffnungen und trugen mit einem Spatel diese Salbe auf die betroffenen ulzerös veränderten Hautgebiete auf. Im Verlauf der Behandlung wurde die Salbe über einen Zeitraum von 14 Tagen 4-5malig angewendet. Am 2. Tag verstärkte sich die Absonderung von Eiter und die Abstoßung der nekrotischen Gewebe, die Geschwüre bedeckten sich mit Granulationen, am 3.-4. Tag nach der ersten Applikation verringerten sich die örtlichen entzündlichen Erscheinungen sowie die Lahmheiten. In Abhängigkeit von der Stärke der vorhandenen Gewebsveränderungen kam es innerhalb von 8 bis 15 Tagen zum Abheilen der Geschwüre.

Über die erfolgreiche Anwendung propolishaltiger Zubereitungen bei der Therapie von Foot Rot des Schafes berichten VINTILA et al. (1980) sowie MUNOZ (1989). Letzterem Autor gelang es, mit einer alkoholischen Propolislösung durch 2-3 lokale Behandlungen im Jahr die Morbidität erheblich zu senken.

### **Anwendung bei der Wundbehandlung**

Zahlreiche Erfahrungen (90 Fälle) bei der Anwendung von Propolissalbe in der Veterinärchirurgie schilderte KULEEW (1964). Die Salbe wurde bei frischen und verdreckten Wunden sowie verschiedenen Hautaffektionen angewendet. Bei frischen Wunden erfolgte eine einfache Wundtoilette, danach wurde die Salbe aufgetragen und ein Verband angelegt. Die Behandlung wurde am dritten, bei Bedarf am fünften Tag fortgesetzt.

Schon nach der ersten Applikation bedeckten sich die Wunden mit jungem, glattem, rosarotem Granulationsgewebe. Nach der zweiten Applikation waren die Wunden fast vollständig mit gesundem, kräftigem Granulationsgewebe bedeckt. Der größte Teil der so behandelten Pferde

konnte nach 7-11 Tagen entlassen werden. Die Anwendung von 15%iger Salbe erwies sich am günstigsten. Die Anwendung einer 20%igen Salbe bewirkte eine üppige Granulation und bei der Anwendung einer 10%igen wurde der Behandlungszeitraum verlängert.

Über einen erfolgreichen Einsatz von Propoliszubereitungen bei der Behandlung von Kastrationswunden und Schnittverletzungen nach der Schur bei Schafen berichteten CETRA et al. (1988).

Eine 15%ige Propolissalbe wurde nach KIWALKINA (1964a) von Aladyschkin zur Behandlung von experimentellen Verbrennungen eingesetzt. Der Versuch wurde an 8 Ochsen und 5 Hunden durchgeführt. Die Applikation nach der Verbrennung erfolgte bei den Hunden nach 1,5 Stunden, bei den Ochsen nach 3 Tagen. Die Salbe wurde jeden 3.-4. Tag bis zur völligen Heilung angewendet. Bei den Rindern kam es nach 31-39 Tagen und bei den Hunden am 63./64. Tag zur Heilung der Wunden. In der unbehandelten Kontrollgruppe der Hunde war die Wundheilung erst am 109. Tag abgeschlossen.

Eine Heilungsquote von 96,2% erzielten RIMBAUND et al. (1987) durch Behandlung traumatischer Wunden bei 15 Hunden und 12 Katzen mit Propoliszubereitungen.

Über die erfolgreiche Behandlung der nach dem Aufplatzen von MKS-Aphten auftretenden Erosionen berichtete KAZAKOW et al. (1964) und ARZUAGA (1988). Erstgenannte Autoren behandelten über 100 Rinder mit 5-10%iger Propolissalbe. Hierbei wurden Therapieergebnisse erzielt, die über denen von mit üblicherweise zur Anwendung kommenden Präparaten lagen. Die Autoren begründeten die guten Therapieergebnisse mit den anästhesierenden, bakteriziden sowie granulationsfördernden Wirkungen von Propolis.

SCHELASCHSKIJ (1964) berichtete über die Dauer der Propolisbehandlung von MKS-Aphten an den Strichen von Rindereutern. Eine Gruppe von 6 Rindern wurde mit 10%iger Propolissalbe, die Kontrollgruppe von 5 Rindern mit üblichen desinfizierenden und adstringierenden Mitteln behandelt. Eine vollständige Heilung der mit Propolissalbe behandelten Euterstriche wurde innerhalb von 7 Tagen erreicht, während bei der Kontrollgruppe der Heilungsprozeß erst am 9.-10. Tag abgeschlossen war. Dabei waren die Milchverluste in der Versuchsgruppe etwa um das 2fache geringer als in der Kontrollgruppe.

SUMANO et al. (1989) verglichen die therapeutische Wirksamkeit handelsüblicher Wundheilmittel mit einer Mixtur, die Propolis und Aloe vera beinhaltete. Sie empfahlen letztere wegen ihrer höheren Effizienz und geringeren Kosten für den breiten Einsatz in der Veterinärmedizin.

IVANA et al. (1991) empfahlen aufgrund eigener guter Erfahrungen den Einsatz propolishaltiger Zubereitungen in der Kleintierchirurgie.

### **Anwendung in der Ophtalmologie**

Die Anwendungsmöglichkeit von Propolis in der Ophtalmologie wurde experimentell von TSCHMODANOWA et al. (1989) untersucht. Anhand verschiedener Propoliszubereitungen wurden die Verträglichkeit, der therapeutische Effekt und die Wirkung auf die Regenerationsprozesse der Konjunktiven sowie der Hornhaut geprüft. Als Modelle dienten mechanische Hornhauttraumen und Verbrennungen an 20 Augen. An weiteren 20 Augen wurde die Verträglichkeit der Propoliszubereitungen verschiedener Zusammensetzung untersucht. Ein guter klinischer Effekt wurde bei der Anwendung von 5%igen Vaselineölpropolisliniment erzielt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten eine Epithelisation der mechanischen Traumen nach 2-3 Tagen, der Verbrennungen nach 6-10 Tagen. 10%iger Ethanolpropolisauszug war am effektivsten bei der Behandlung von infizierten Rißwunden der Haut an den Lidern. Bei den an 20 Kaninchen durchgeführten experimentellen Untersuchungen wurden keine Nebenwirkungen der Präparate festgestellt

MARTINEZ et al. (1992) verwendeten erfolgreich Propolis-Augentropfen für die Behandlung der infektiösen Keratokonjunktivitis bei Kälbern.

### **Anwendung als wachstumsstimulierendes Mittel**

IWANOW (1960) beschrieb eine Anwendung von Propolis bei der Behandlung von Kümmerern. Hierbei wurden drei Gruppen von Ferkeln zusammengestellt, von denen die erste Gruppe (20 Ferkel) eine durchschnittlichen Lebendmasse von 7,2 kg, die zweite Gruppe (12 Ferkel) 7,5 kg und die dritte Gruppe (15 Ferkel) 8,0 kg besaßen. In der ersten Gruppe bekamen die Ferkel 5 Tage hintereinander auf nüchternen Magen jeweils 100 ml einer 10%ig propolisierten Milch, die zweite Gruppe bekam im selben Zeitraum jeweils 500 Gramm eines Breies aus Weizenschrot, worin je Portion 10 Gramm Propolis enthalten war. Die dritte Gruppe blieb unbehandelt. Während des Versuches waren die Fütterungs- und Haltungsbedingungen aller Tiere einheitlich.

In der vierten Woche wurden die erste und zweite Gruppe erneut nach gleichem Schema behandelt, jedoch kamen hier 15%ige propolisierte Milch und pro Breiportion 15 Gramm Propolis zum Einsatz. Im Zeitraum des Versuches wurden regelmäßige Wägungen der Tiere durchgeführt. Innerhalb von 122 Tagen vergrößerte sich die Lebendmasse der Tiere der ersten Gruppe auf einen Durchschnitt von 39,3 kg, der zweiten Gruppe auf 43,0 kg und der

Kontrollgruppe auf 23,3 kg. So betrug die Differenz der Lebendmasse zwischen der ersten und der Kontrollgruppe 17 kg und zwischen der zweiten und der Kontrollgruppe 19,7 kg. In der Kontrollgruppe verendeten zwei Tiere.

Versuche zur wachstumsfördernden Wirkung der Propolis wurden durch die selben Autoren an nichtaufzuchtwürdigen Ferkeln mit gleicher Lebendmasse durchgeführt. 10 Ferkel erhielten nüchtern je 100 ml Milch mit 5% Propoliszusatz 5 Tage hintereinander. Die Kontrollgruppe (10 Ferkel) erhielt im selben Zeitraum die gleiche Menge abgekochter Milch. Nach drei Wochen erfolgte eine Wiederholung. Die Beobachtung dauerte 53 Tage. Die Anwendung der Milch mit Propoliszusatz führte bei den Ferkeln zu einer Erhöhung des Appetites. Ihr Allgemeinbefinden verbesserte sich. Sie wurden vitaler. Die Lebendmasse der behandelten Tiere war am Versuchsende etwa doppelt so hoch wie die der Kontrollgruppe.

KIWALKINA (1964a) berichtete über die von Dutow an Kaninchen durchgeführten Versuche zur Wirkung verschiedener Propoliszubereitungen auf deren Wachstum sowie die Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten. Auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen an 280 Kaninchen im Absetzalter wurde die Feststellung getroffen, daß Propolis eine Stimulierung des Wachstums und der Entwicklung des Organismus bewirkt. Es wurden höhere Tageszunahmen und eine bessere Futtermittelverwertung erzielt. Bei Zusatz von Ethanolpropolisextrakt zum Futter stiegen die mittleren Tageszunahmen um 1,7 g, bei Wasserpropolisauszug um 1,4 g und bei Zusatz von Propolispulver war eine Erhöhung auf 2,5 g im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Weiterhin erhöhte sich der mittlere Hämoglobingehalt, der Gesamteiweißgehalt und die Widerstandsfähigkeit gegen Pasteurelleninfektionen. In den Versuchsgruppen blieben im Vergleich zu den Kontrollgruppen 5-7% mehr Tiere am Leben.

Die gleiche Autorin berichtete über die prophylaktische Anwendung eines Wasserpropolisauszuges sowie ethanolschen Propolisextraktes in mit Parathyphus und Pullorumseuche befallenen Beständen. Der Versuch umfaßte 18417 Entenküken und 1264 Hühnerküken.

Die prophylaktische Wirkung der Propolis wurde mit der von Biomycin und Furazolidon verglichen. Die Propoliszubereitungen wurden zusammen mit dem Futter 1mal täglich, die anderen Präparate 2mal täglich im Zeitraum von 10 Tagen appliziert. In der Versuchsgruppe waren die Verluste der Entenküken um das 12fache und bei den Hühnerküken um das 2fache geringer als in der Kontrollgruppe. Im Alter von 20 Tagen war die durchschnittliche Lebendmasse der mit Propolis behandelten Entenküken um 42 g höher als in der Kontrollgruppe und um 44 g höher als in der Gruppe, die mit Furazolidon behandelt wurde.

In einem anderen Bestand wurden Enteneier zur Verringerung der Brutverluste mit 12%igem Wasserpropolisauszug, einer 1%igen Emulsion (bestehend aus ethanolschen Propolisextrakt und Wasser), Streptomycinlösung, Penicillinlösung oder Chlorkalklösung behandelt. Bei den Enteneiern, die drei Minuten mit Propoliszubereitungen oder Antibiotikalösung behandelt wurden, traten keine Verluste auf. Bei Behandlung der Eier mit 5%iger Chlorkalklösung waren 19% und in der Kontrolle 27% Brutverluste festzustellen.

Untersuchungen von TETEREW et al. (1992) bestätigten eine im Vergleich zu einer Kontrollgruppe verstärkte Lebendmassezunahme von Küken bei Verfütterung bestimmter Propolismengen. Nach der Schlachtung bestanden keine Unterschiede in Qualität und Geschmack des Fleisches beider Gruppen.

### **Andrologische Anwendung**

ROMANOW (1961) berichtete über die Anwendung von 10%iger Vaselinepropolislösung bei Trichomoniasiserkrankungen von Zuchtbullen. Vor der Behandlung erfolgte eine Waschung des Präputialsackes mit einer 5%igen Natriumchloridlösung. Danach wurden 10-15 ml der Propolislösung in den Präputialsack appliziert. Die Behandlung erfolgte insgesamt 3mal, jeweils mit einem Tag Abstand. Nach 10 Tagen waren mikroskopisch in Präputialspülproben sowie im Sperma keine Trichomonaden nachweisbar.

### **Anwendung in der Gynäkologie**

KAZAKOW et al. (1964) behandelten nichtinfektiöse Vaginitiden bei Rindern mit 10%iger Propolissalbe auf Vaselinebasis. Vor dem Einführen eines mit der Salbe getränkten Tampons

erfolgte eine gründliche Spülung der Schleimhäute mit Kaliumpermanganatlösung 1:2000. Die Dauer der Behandlung, die gute Ergebnisse zeigte, betrug 6-8 Tage.

Eine Heilungsquote von 78% wurde von BOITOR et al. (1982) bei der Therapie von puerperalen Endometritiden bei Rindern mit alkoholischen Propolisextrakten erreicht.

Bei von ERSKI et al. (1990) durchgeführten In-vitro-Untersuchungen an Keimen, isoliert aus Endometritiden bei Rindern, konnte ein antimikrobieller Effekt von Propolis in 58% der Fälle festgestellt werden.

JIMINEZ et al. (1993) behandelten 142 Milchkühe mit postpartalen Endometritiden mit 5 bis 10%igen Propolisextrakten in 70%igem Ethanol. Alle Rinder erhielten intrauterine Infusionen von 50 ml dieser Extrakte. Nach 72 Stunden erfolgte eine klinische Untersuchung. Alle Rinder mit katarrhalischer Endometritis waren nach der ersten Behandlung geheilt. Rinder mit purulenter Endometritis oder Pyometra bekamen eine oder zwei zusätzliche intrauterine Infusionen, jeweils 40 ml in 72stündigen Intervallen. Nach der dritten Behandlung waren 81,7% der Tiere geheilt. Dabei wurde festgestellt, daß verschieden hohe Konzentrationen der Propolisextrakte im Anwendungsbereich von 5 bis 10% keinen Einfluß auf das Therapieergebnis hatten. Rinder mit mehreren Kalbungen genasen schneller.

BARSKOW et al. (1988) verglichen die therapeutische Wirksamkeit von verschiedenen Medikamenten bzw. Antibiotika sowie propolishaltigen Zubereitungen bei der Behandlung verschiedener Formen der Endometritiden, Vaginitiden und Mastitiden. Eine Vergleichsbehandlung von Endometritiden mit verschiedenen Präparaten zur Bestimmung der therapeutischen Effektivität ergab keine Verkürzung der Behandlungsdauer durch Propolis-anwendung. Jedoch begann das erste Stadium des Geschlechtszyklus der mit Propolisliniment von katarrhalischer Endometritis geheilten Rinder am 20. Tag, der mit einer kommerziellen Antibiotikalösung behandelten am 25,1. Tag. Bei der Behandlung von Rindern mit eitrig-katarrhalischer Endometritis zeigten diese Zeiträume mit 25,8 Tagen sowie 41,3 Tagen noch deutlicher die Vorzüge der Therapie mit Propolisliniment. Die Behandlung der verschiedenen Formen von Vaginitiden der Rinder mit 5%igem Propolisliniment oder Propolis-suppositorien wies fast die gleiche therapeutische Effektivität auf. Die Zeiten bis zur Genesung lagen dementsprechend bei 6,5 +/- 1,5 und 6,6 +/- 1,6 Tagen. Die Zeit der Sterilität lag im Mittel bei 35 Tagen. Die Therapie mit der kommerziellen Antibiotikalösung dauerte 8,6 +/- 1,9 Tage vom Beginn der Behandlung bis zur Gesundung und im Mittel 38 Tage bis zur erfolgreichen Besamung. Die Ergebnisse der Therapie bei Kühen mit seröser Mastitis waren folgende: Von Rindern, die mit einem Propolisliniment aus Lebertran oder Sonnenblumenöl

behandelt wurden, gesunden 90,3% der Tiere nach 4,6 +/- 0,3 Tagen. Von den mit Antibiotika behandelten Tieren (Benzylpenicillinkaliumsalz und Streptomycinsulfat) gesunden 85,7% nach 5,9 +/- 0,4 Tagen.

Bei der Behandlung von Rindern mit katarrhalischer Mastitis lagen folgende Ergebnisse vor: Beim Propolisliniment wurde eine therapeutische Effektivität von 89,3% nach 5,3 +/- 0,3 Tagen und bei Antibiotika 84,2 % nach 6,6 +/- 0,5 Tagen erreicht. Bei der Behandlung von hämorrhagischer Mastitis mit Propolisliniment wurde ein Therapieeffekt von 80% nach 6,5 +/- 0,5 Tagen erzielt. Ein Parallelversuch mit mastitiskranken Rinder mit einer pastösen Propoliszubereitung (mit Polyethylenglykol 400) zeigte wenig Abweichung bei Therapieeffizienz und Dauer gegenüber den anderen angewendeten Propoliszubereitungen.

Durch die Anwendung verschiedener Propoliszubereitungen bei Rindermastitiden unterschiedlicher Genese wurde von MIROLYUBOW et al. (1980) festgestellt, daß mit Propoliszubereitungen gute therapeutische Effekte zu erzielen sind.

MERESTA et al. (1989) führten mit propolishaltigen Präparaten Behandlungen an 146 Rindern mit akuten Mastitiden durch. Von den 146 behandelten Rindern wurden 125 Fälle (86,6%) geheilt. Die Heilquote war dabei abhängig von der Art der Mastitiserreger. Eine 100%ige Heilung wurde bei Infektionen mit *Candida albicans*, eine 85%ige bei Infektionen mit *Escherichia coli*, eine 91%ige bei *Staphylococcus species*-Infektionen und eine 84,3%ige bei Infektionen mit *Streptococcus species* erzielt. Die hohe Wirksamkeit der Propolis zeigte sich darüber hinaus bei der Behandlung von Mastitiden mit antibiotikaresistenten Keimen als Ursache.

Ein im Handel erhältliches propolishaltiges Präparat zur Mastitisbehandlung wurde von KEGL et al. (1993) auf Wirksamkeit überprüft. Die Autoren stellten fest, daß die Effizienz dieses Präparates bei der Behandlung von Mastitiden, die durch grampositive Keime bedingt waren, unter der von antibiotikahaltigen Handelspräparaten lag. In den Fällen, in denen andere Keime das Mastitisgeschehen bestimmten, waren keine Wirkungsunterschiede der verschiedenen Medikamente feststellbar.

Die Wirkung von Infusionen propolishaltiger Präparate in das gesunde Rindereuter untersuchten ROMVARY et al. (1993). Es wurde eine Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit sowie des Chloridgehaltes der Milch innerhalb der physiologischen Grenzen festgestellt. Eine 6 Tage nach Applikation anhaltende Erhöhung der Zellzahlen in der Milch über die physiologischen Werte wurde beschrieben.

### **Anwendungen bei Jungtiererkrankungen**

TURSUNALIEW (1985) behandelte Lämmer mit Erkrankungen durch virulente Formen von *Escherichia coli*. Die täglich angewendeten Präparate Dibomycin und 10%iger Ethanolpropolisextrakt in Wasser wiesen, getrennt eingesetzt, eine hohe therapeutische Effektivität auf, die bei 83,3 bis 100% lag. Bei kombinierter Anwendung der Mittel verkürzte sich der Behandlungszeitraum. So genasen die Lämmer bereits nach ein- bis zweimaliger Behandlung, während beim alternativen Einsatz der Präparate ein Behandlungszeitraum von 9 bis 11 Tage erforderlich war.

Die Anwendung von Propolispräparaten in Kombination mit Antibiotika untersuchten IBRAGIMOWA et al. (1988). Kälber, die an Salmonellose (*Salmonella enteritidis*) erkrankt waren, wurden in drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde mit Gentamycin in der vorgeschriebenen Dosierung behandelt. Die zweite Gruppe wurde mit der gleichen Dosis Gentamycin sowie mit Milch mit Propoliszusatz behandelt. Die dritte Gruppe erhielt die halbe Dosis Gentamycin sowie die gleiche Menge an Milch mit Propoliszusatz. Die Kälber der ersten Gruppe genasen nach zwei- bis dreimaliger Applikation des Gentamycin. Die Tiere, die Gentamycin und Milch mit Propoliszusatz bekamen, wurden in der Regel nach der ersten Behandlung gesund. In seltenen Fällen mußte eine zweite Applikation erfolgen. Bei der dritten Gruppe war ein längerer Behandlungszeitraum erforderlich. Bei einem zweiten Versuch wurden Kälber behandelt, die *Escherichia coli* der Serogruppen 015 und 0139 infiziert waren. Vor dem Versuch wurde ein Resistogramm angefertigt. Die erkrankten Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen die Kontrollgruppe mit Ampicillin zweimal täglich intramuskulär behandelt wurde. Die gleiche Behandlung erfolgte auch bei der Versuchsgruppe. Sie erhielt aber zusätzlich Milch mit Propoliszusatz. Die Kontrollgruppe gesundete am 7.-10. Tag nach Versuchsbeginn, die Versuchsgruppe am 3.-4. Tag.

Die hohe Effizienz eines propolishaltigen Handelspräparates bei der Therapie von Darmerkrankungen des Kalbes bestätigten KONDRACKI et al. (1994).

### **Behandlung von Trichophytie**

Eine 15%ige Propolisalbe wurde von BARTUEW (1961) zur Behandlung der Glatzflechte bei 25 Kälbern eingesetzt. Die Salbe wurde täglich auf die betroffenen, zuvor von Krusten und Haaren befreiten Stellen aufgetragen. Nach 6-7 Tagen begann sich die befallene Stelle zu behaaren, die Haut wurde weich und elastisch. Rezidive wurden nicht beobachtet.

GOLOSCHAPOW (1963) berichtete über die erfolgreiche Anwendung von 10%igem Ethanolpropolisextrakt bei der Behandlung von Glatzflechte an 20 Kälbern. Die täglichen Pinselungen der betroffenen Areale führten nach drei Tagen zum Abheilen.

Propolisvaselinesalbe und Propolispetroleumgelee, beides 10%ig, wurden von LORI et al. (1986) und LORI (1990) ebenfalls erfolgreich bei boviner Trichophytie angewendet.

### **Behandlung der Europäischen Faulbrut**

Über die Behandlung von Bienenvölkern, die mit Europäischer Faulbrut befallenen waren, berichtete TSCHIRKUNOW (1961). 14%iger Propolisethanolextrakt wurde im Verhältnis 1:9 in Zuckersirup eingemischt und den Bienen beigefüttert. Pro Volk erfolgten Gaben von einem Liter dieses Sirups 3mal in einem Abstand von jeweils 3 Tagen. 1958 wurden 116 Völker, von denen 38 erkrankt waren, behandelt. Die erkrankten Völker genasen, bei den übrigen waren keine Erkrankungen aufgetreten. 70 Völker einer benachbarten Imkerei dienten als Kontrolle. Von ihnen waren 35 Völker erkrankt, deren Heilung im Verlauf des Versuches nicht eintrat. 1959 traten in den 38 Völkern nur bei 3 Rezidive auf, die nach erneuter Behandlung genasen. 1960/61 traten in dieser Imkerei im Gegensatz zur Kontrollimkerei keine Erkrankungen auf.

### **Anwendung als Antiparasitikum**

HOLLANDS et al. (1984) applizierten an mit Eimeria infizierte Kaninchen über einen Zeitraum von 4 Wochen einen Ethanolpropolisextrakt. Sie stellten eine Verringerung der Anzahl ausgeschiedener Eimeria Oozysten um 72 bzw. 92% fest. Die kokzidiostatische Wirkung eines 3%igen Propolisethanolextraktes wurde von HOLLANDS et al. (1988) mit der Wirkung von Sulfadimidin (0,2%) oder Sulfaquinoxalin (0,1%) bei der Therapie von mit Eimeria magna, E. media und E. perforans infizierten Kaninchen verglichen. Die kokzidiostatische Wirkung der Propolis war stärker als die der Sulfonamide. Eine biologische Probe zur Qualitätskontrolle von Ethanolpropolisextrakt, der als Kokzidiostatikum auf Hühnerfarmen angewendet wurde, beschrieben HOLLANDS et al. (1988a). Als Testerreger wurden Kulturen der Protozoe Chilomas paramecium Erhenberg 1838 verwendet.

### **Sonstige veterinärmedizinische Anwendungen**

GOLOSCHAPOW (1963) verwendete 10%igen Propolisethanolextrakt bei der Behandlung von Erkrankungen des Verdauungstraktes bei Wiederkäuern. Besonders bewährte sich das Mittel bei anhaltenden Atonien der Vormägen. Die betroffenen Tiere (Rinder, Schafe, Ziegen) erhielten diesen Extrakt im Verhältnis 1:8 in Wasser gemischt 2-3mal täglich verabreicht. Alle behandelten Tiere genasen.

## **2.2 Zum Erregerspektrum und lokaler Therapiemöglichkeit der Otitis externa des Hundes**

### **2.2.1 Erregerspektrum der Otitis externa des Hundes**

Viele Autoren fanden bei der Otitis externa des Hundes ein relativ charakteristisches Erregerspektrum.

So vertrat CIESLICKI (1991) in einer Auswertung von mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen bei Otitis externa-Fällen, die aus in Deutschland durchgeführten Studien stammten, die Meinung, daß das Keimspektrum mehr oder weniger qualitativ identisch sei, jedoch Unterschiede in der Isolierungshäufigkeit der einzelnen Keime bestanden. Er isolierte aus 144 Otitis externa-Fällen 168 Erreger. Hierbei waren *Malassezia pachydermatis* mit 58 und *Staphylococcus aureus* mit 36 Isolaten am häufigsten vertreten. Es folgten coliforme Keime mit 20 Isolaten, Streptokokken mit 17, *Pseudomonas* spp. mit 11, aerobe Sporenbildner mit 9, *Proteus* mit 8, *Candida* mit 3 Isolaten. Die restliche isolierte Erregerpalette bestand aus *Micrococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* spp., *Micrococcus canis* und *Mucor*.

KRAFT (1990) stellte folgende Reihenfolge der Häufigkeit des Auftretens der an Otitis externa beteiligten mikrobiellen Erreger auf: *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *E. coli* u.a. sowie *Pityrosporum* sp., *Candida* sp. und *Aspergillus* sp..

KISS et al. (1994) isolierten bei insgesamt 515 Fällen von Otitis externa in 45% der Fälle *Malassezia pachydermatis*, in 36% *Staphylococcus intermedius* und in 9% *Pseudomonas aeruginosa*.

Die häufigsten Keime, die von SCUPIN et al. (1971) aus 200 Proben ohne Berücksichtigung des mykologischen Spektrums isoliert wurden, waren *Pseudomonas* sp. mit 41,8%, gefolgt von Mikrokokken mit 36,4% und *E. coli* mit 5,5%.

Eine Isolierung von Hefen, Staphylokokken, *Pseudomonas* und *E. coli* in hohen Quoten wurde von NICKLAS et al. (1979) und STELLMACHER et al. (1986) beschrieben.

Ein deutlich gehäuftes Auftreten von *Malassezia pachydermatis* bei chronischen Otitiden im Vergleich zu akuten stellten WALLMANN et al. (1990) fest. Die Verfasser untersuchten die Keimflora bei 40 an akuter Otitis externa (Erkrankung nicht länger als 6 Wochen) sowie bei 40 an chronischer Otitis externa erkrankten Hunden. In den 109 Isolaten der akuten Fälle dominierten *Staphylococcus species* mit 36,7%, gefolgt von *Malassezia pachydermatis* mit 22,9% und *Bacillus species*. In den 40 chronischen Otitis externa-Fällen ergab sich folgende Differenzierung der 125 Isolate: *Malassezia pachydermatis* dominierte mit 52,0%, gefolgt von *Staphylococcus species* mit 28,8% und *Streptococcus species* mit 4,8%.

Untersuchungen über das Keimspektrum bei Otitis externa in 8 Kleintierpraxen, die über die gesamte Bundesrepublik Deutschland verteilt lagen, wurden von der BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH (1991) durchgeführt. Es wurde aus 92 Tupferproben folgendes Spektrum isoliert: Hefen 53, hämolysierende *Staph. aureus* 42, Bacillaceae 14, Mikrokokken 11, hämolysierende *E. coli/ coliforme* Keime 10, *Proteus vulgaris* 6, *Pseudomonas* 5 und sonstige 9, davon 3mal unspezifische Mischflora, 3mal vergrünende Streptokokken, 2mal hämolysierende Streptokokken und 1mal Schimmelpilze.

In einer Veröffentlichung von MÜLLER et al. (1994) wurden mikrobiologische Ergebnisse von 413 Tupferproben von Otitis externa-Fällen bei Hund und Katze folgendermaßen dargestellt: die häufigsten isolierten Keimspezies waren koagulasepositive Staphylokokken,  $\beta$ -hämolysierende Streptokokken und *Proteus spp.*, wobei die Staphylokokken die größte Gruppe der Keimisolate darstellten. Aus der Gesamtanzahl der Tupferproben lagen in 82% positive bakteriologische und in 28% positive mykologische Befunde vor. Von den mykologisch nachgewiesenen Erregern stellte *Malassezia pachydermatis* mit 90% den Hauptanteil. Eine nach Häufigkeit des Auftretens der Erreger geordnete Übersicht des von verschiedenen Autoren differenziert angeführten Erregerspektrums bei Otitis externa des Hundes gibt Tabelle 5.

Aus den Literaturangaben geht deutlich hervor, daß eine Majorität von grampositiven Erregern sowie Hefen bei der Otitis externa des Hundes vorlag. Gerade diese Erreger erwiesen sich bei Untersuchungen in vitro als sensibel auf Propolis (vgl. KIWALKINA 1964b, KARIMOWA 1960, ALEKSANDROW et al. 1974, ČIŽMÁRIK et al. 1976a).

Aus diesen Tatsachen abgeleitet, war es zweckmäßig und durchaus begründet, Propoliszubereitungen in der Therapie von Otitis externa bei Hunden klinisch zu erproben.

**Tabelle 5: Angaben verschiedener Autoren zum isolierten Erregerspektrum der Otitis externa des Hundes**

Autor Anzahl der Proben	Isoliertes Spektrum				
SCUPIN et al. (1971) 200 Proben	Pseudomonas sp. 41,8%	Mikrokokken 6,4%	E. coli 5,5%	Proteus 1,8%	Streptokokken 1,8%
NICKLAS et al. (1979)  446 Proben	Malassezia pachydermatis  204 Isolate	Pseudomonas aeruginosa.  120 Isolate	Staphylo- coccus aureus  94 Isolate	β- hämolyisierende Streptokokken  27 Isolate	Proteus sp.  23 Isolate
STELLMACHER et al. (1986)  1403 Proben	Hefen  636 Isolate, davon 129 Pityrosporum pachydermatis, 63 Candida sp. u.a.	Pseudomonas  541 Isolate	E. coli  163 Isolate	Staphylococcus spp.  163 Isolate davon 129 Staph. aureus	Klebsiella  101 Isolat
KRAFT (1990)	Staphylococcus aureus	Proteus vulgaris	Pseudomonas aeruginosa	Streptokokken	E. coli u.a.
WALLMANN et al. (1990)  80 akute Otitis Fälle	Staphylococcus sp.  36,7%	Malassezia pachydermatis  22,9%	Bacillus sp.  11,9%	Pseudomonas sp.  6,4%	andere gramnegative Keime  6,4%
WALLMANN et al. (1990)  80 chronische Otitis Fälle	Malassezia pachydermatis  52,0%	Staphylococcus sp.  28,8%	Streptococcus. sp.  4,8%	Proteus sp.  4,0%	andere grampositive Keime  2,4%
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH (1991)  92 Proben	Hefen  53 Isolate	hämolyisierende Staph. aureus  42 Isolate	Bacillaceae  14 Isolate	Mikrokokken  11 Isolate	hämolyisierende E. coli / coliforme Keime  10 Isolate
CIESLICKI (1991)  144 Proben	Malassezia pachydermatis  58 Isolate	Staphylococcus aureus  36 Isolate	coliforme Keime  20 Isolate	Streptokokken  17 Isolate	Pseudomonas spp.  11 Isolate
KISS et al. (1994)  515 Proben	Malassezia pachydermatis  45%	Staphylococcus intermedius  36%	Pseudomonas aeruginosa  9%		
MÜLLER et al. (1994)  413 Proben Hund /Katze	koagulasepositive Staphylokokken	β-hämo- lyisierende Streptokokken	Proteus spp.	mykologische Befunde davon 90% Malassezia pachydermatis	

Flavobakterien 1,8%	Alcaligenes 1,8%	Providentia 1,8%	Mischflora 7,3%		
Hefen wie Candida tropicalis, Candida albicans  20 Isolate	Bakterien wie E. coli, Klebsiella u.a.  14 Isolate	Schimmelpilze  6 Isolate			
Proteus  91 Isolate	Streptococcus  42 Isolate	Micrococcus  29 Isolate	Schimmelpilze  17 Isolate	Hautpilze  7 Isolate	
Pityrosporum	Candida	Aspergillen			
andere Hefepilzarten  3,7%	andere grampositive Keime  3,7%	Proteus sp.  3,7%	Schimmel- pilzarten  1,8%	andere Entero- bacteriaceae  1,8%	Strepto- coccus. sp.  0,9%
Pseudomonas sp.  2,4%	andere gamnegative Keime  2,4%	andere Hefepilzarten  1,6%	Bacillus sp.  1,6%		
Proteus vulgaris  6 Isolate	Pseudomonas  5 Isolate	sonstige 9 Isolate davon unspezifische Mischflora 3 Isolate vergrünende Streptokokken 3 Isolate hämolysierende Streptokokken 2 Isolate Schimmelpilze 1 Isolat			
aerobe Sporenbildner  9 Isolate	Proteus  8 Isolate	Candida  3 Isolate	Rest der Isolate Micrococcus spp. Aeromonas spp. u.a.		

### 2.2.2 Lokale Therapiemöglichkeiten bei Otitis externa des Hundes

In der Fachliteratur wird auf eine Vielzahl von Möglichkeiten der lokalen medikamentösen Therapie der Otitis externa bei Hunden hingewiesen.

Nach Angaben von KLARENBEEK (1950) wurden Mitte des 20. Jahrhunderts folgende Mittel zur Otitisbehandlung angewandt: Lysol, Jodoform, Jodxeroform, Jodoformether, Wasserstoffperoxidlösungen, Teer- und Kreolinöl, Zink-, Zinkichtyolsalbe und Borsäuretalkum.

In der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts war eine ständige Suche nach effektiveren Mitteln zur Behandlung der Otitis externa manifest. Antibiotika und Kortikosteroide wurden in den Umfang dieser Mittel aufgenommen. Eine breite Palette von Mittel zur Behandlung der Otitis externa wurde von CHRISTOPH (1977) genannt. Darunter befanden sich Zubereitungen wie Zinksalben, sulfonamid- und antibiotikahaltige Salben oder deren Kombinationen mit Kortikosteroiden. Weiterhin wurden Adstringenzen wie Silbernitratlösungen angeführt.

In den letzten 20 Jahren setzte sich zunehmend die Anwendung handelsüblicher Kombinationspräparate (bestehend aus Antibiotika, Antimykotika, Kortikosteroiden und Lokalanästhetika) zur lokalen Otitis externa-Behandlung durch.

Hinsichtlich der Auswahl der Medikamente zur Lokalbehandlung der Otitis externa konnte in der ausgewerteten Fachliteratur kein einheitliches Herangehen ermittelt werden. Die Meinungen der Tierärzte in dieser Frage gehen weit auseinander. KRAFT (1990) empfahl eine auf verschiedene Formen der Otitis externa ausgerichtete Therapie. Dieser Autor sprach sich für eine spezifische, die Polypragmasie ausschließende Behandlung der Otitiden aus. Als Therapeutika wurden Kortikosteroide, Antibiotika, Antiparasitaria, Silbernitratlösung, Tanninspiritus, Jodglyzerin, Ichtyolsalbe, Lebertransalbe, Salicylspiritus und Nystatinpräparate angeführt. Hingegen vertraten SCUPIN et al. (1971) in einem Bericht über ihre umfangreichen Erfahrungen bei der Behandlung von Otitis externa die Auffassung, daß es nicht ratsam sei, nur ein Therapeutikum einzusetzen, da oft nach anfänglicher Besserung Rezidive auftraten. Diese Autoren brachten in Abhängigkeit vom Resistogramm bei der Behandlung stets mehrere Antibiotika zum Einsatz oder benutzten die im Handel erhältlichen Kombinationspräparate. Weiterhin wurde auf Mittel wie Zink-Lebertranliniment, Solutio Castellani, Rivanol, Lotagen, Prontosiltinktur hingewiesen.

Analog ging CIESLICKI (1991) bei der Auswahl der effektiven Medikamente für die Behandlung der Otitiden vor, wobei er sich auf die Veröffentlichungen Gedeks et al. (1979) und Neumanns et al. (1983) stützte und davon ausging, daß ein Therapeutikum gleichzeitig gegen alle in Frage kommenden relevanten Erreger wirksam sein muß, da an der Otitis externa des Hundes sowohl Hefen als auch grampositive oder/und gramnegative Erreger beteiligt sein können. Zudem können die aufwendigen mikrobiologischen Methoden zur Isolierung und Bestimmung der Erreger in der Alltagspraxis nicht durchgeführt werden. Da kein antimikrobieller Wirkstoff zur Verfügung steht, der gleichzeitig gegen alle bei der Otitis externa des Hundes auftretende Erreger wirkt, ist eine Kombination von einem Antimykotikum mit einem Antibiotikum unerlässlich, um eine zufriedenstellende therapeutische Wirksamkeit zu gewährleisten. Ein antiinflammatorischer Effekt kann durch Zusatz von Glukokortikoiden erreicht werden. In den Untersuchungen von CIESLICKI (1991) wurde diesbezüglich festgestellt, daß durch Zusatz von Prednisolon zu einem Miconazol und Polymyxin B enthaltendem Präparat zwar die mykologisch-bakteriologische Heilungsrate nicht beeinflußt wurde, die klinische Heilung aber signifikant schneller vonstatten ging.

In den letzten Jahren wurde weiter nach qualitativ neuen und effektiveren Medikamenten - vor allem Kombinationspräparaten - geforscht. KISS et al. (1994) berichteten über ein neues, zur Behandlung der Otitis externa entwickeltes Kombinationspräparat, dessen wirksame Bestandteile Ketoconazol, Gentamycin und Mazipredonum hydrochlorid sind.

Die Angaben über die Behandlungsdauer der Otitis externa, die aus den Publikationen verschiedener Verfasser stammen, unterscheiden sich wesentlich voneinander. So berichtete KORTE (1962), daß die durchschnittliche Behandlungsdauer seiner Otitis externa-Patienten bei 19 Tagen lag.

Die Behandlungsdauer der Otitis externa wurde von SCUPIN et al. (1971) als sehr variabel eingeschätzt. So wurden einige Fälle angegeben, wo nach einer einmaligen Behandlung eine Genesung eintrat, dagegen mußten andere Patienten oft wochenlang täglich behandelt werden. Einige Patienten befanden sich sogar jahrelang in intermittierenden Zeiträumen in Behandlung.

In einer Veröffentlichung von WALLMANN et al. (1990) wurde festgestellt, daß die Therapiedauer von chronischen Otitiden, die mit verschiedenen im Handel erhältlichen Kombinationspräparaten behandelt wurden, wesentlich länger als bei akuten Otitis externa-Fällen war. Sie mutmaßten, daß *Malassezia pachydermatis* der Grund dafür sei, da sie häufiger bei chronischen als bei akuten Otitiden aufträte. So waren die meisten chronischen Fälle mit Hefepilznachweis nach 2-3 Monaten Behandlung mit einem handelsüblichen Kombinationspräparat, das Miconazol beinhaltet, geheilt. Weiterhin wurde von einem beträchtlichen Anteil von Rezidiven nach erfolgreichen Behandlungen berichtet.

### 2.2.3 Resistenzsituation bei den wesentlichen Erregerarten der Otitis externa

Trotz eines reichhaltigen Angebotes verschiedener Präparate ist die Therapie der Otitis externa häufig schwierig und langwierig. Das resultiert zum großen Teil aus einer Polyresistenz der Erreger gegen zur Anwendung kommende Antibiotika. Deswegen konnten MÜLLER et al. (1994) bei Untersuchungen zur Sensibilität der am häufigsten aus 413 Otitis externa Ohrtrupfern bei Hund und Katze isolierten Keimspezies koagulasepositive Staphylokokken,  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken, *Pseudomonas* spp. und *Proteus* spp. auf Antibiotika in den gängigen Otitispräparaten keine generellen Empfehlungen eines einzelnen Wirkstoffes geben.

TROLLDENIER (1995) verzeichnete in der Bundesrepublik Deutschland eine steigende Tendenz von Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika bei veterinärmedizinisch bedeutsamen bakteriellen Erregern. In Tabelle 6 ist die Resistenzsituation in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1992 für einige von Hunden stammende Bakterienstämme auf häufig in Otitis externa-Präparaten vorhandene Antibiotika dargestellt.

**Tabelle 6: Resistenz von Hund stammender Erregerstämmen gegen Antibiotika, die häufig in kommerziellen Otitispräparaten enthalten sind (in Prozent) (nach TROLLDENIER 1995)**

	Staph. aureus		Str. spp.		Ps. aeruginosa	
	%	(n)	%	(n)	%	(n)
Gentamycin	8,9 %	(436)	63,8 %	(569)	35,3 %	(214)
Kanamycin	31,8 %	(233)	70,2 %	(215)	85,7 %	(56)
Chloramphenicol	34,3 %	(449)	22,8 %	(610)	88,1 %	(185)
Neomycin	26,6 %	(327)	87,3 %	(425)	51,4 %	(181)
Framycetin	2,2 %	(186)	27,4 %	(113)	22,7 %	(44)
Polymyxin B	55,8 %	(285)	91,6 %	(430)	11,9 %	(168)

in Klammern ist die Gesamtanzahl der geprüften Stämme angegeben

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Zur Wirkung von Propoliszubereitungen bei der Otitis externa des Hundes**

#### **3.1.1 Material und Methoden**

##### **3.1.1.1 Gewinnung und Extraktion der Propolis**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten In-vitro-Untersuchungen sowie die Behandlung der Otitis externa-Patienten der ersten Gruppe wurden mit Propolis einer bei Milmersdorf, Krs. Templin (Land Brandenburg) gelegenen Imkerei durchgeführt. Die Propolis gewann ich 1994 und 1995. Beim Abkratzen der Propolis von den Wabenrähmchen wurde angestrebt, mechanische Beimengungen und Wachs auszuschließen. Die gewonnenen Propolispläne wurden zu kugelförmigen Gebilden gepreßt, wodurch eine bessere Lagerung und Handhabung erreicht wurde. Die Propolis wurde in verschlossenen Glasgefäßen im Kühlschrank aufbewahrt.

Von den in der Literatur beschriebenen verschiedenen Möglichkeiten der Propolisextraktion erschien die Extraktion mit Ethanol für den Zweck dieser Arbeit am besten geeignet. Der Ethanolpropolisextrakt beinhaltet mit Sicherheit antibakterielle, antimykotische und antivirale Wirkstoffe der Propolis, außerdem läßt sich der Ethanolextrakt gut zur Herstellung propolishaltiger Zubereitungen verwenden. Da in den meisten Untersuchungen dieser Arbeit gleiche Propolischargen aus einer Imkerei verwendet wurden, lagen somit qualitativ gleiche Inhaltsstoffe in gleicher quantitativer Zusammensetzung für alle In-vitro- und In-vivo-Versuche vor. Dadurch wurde eine Bewertung und Einordnung bestimmter Effekte möglich.

Die Propolis wurde mit 70%igem Ethanol in folgenden Schritten extrahiert, wodurch sowohl alkohollösliche wie auch wasserlösliche Substanzen gewonnen wurden:

- Vor der mechanischen Zerkleinerung wurde die Propolis auf eine Temperatur von  $-15^{\circ}\text{C}$  gekühlt, um die Sprödigkeit der Substanz zu erhöhen. Anschließend wurde sie mechanisch in einer Moulinette zu einem Pulver zerkleinert.
- Ein Überstand Propolispulver sowie 70%iges unvergälltes Ethanol (bezogen von der Fa. Alkohol Handels Kontor) wurde in Glasflaschen gefüllt, diese verschlossen und bei Zimmertemperatur 48 h in einem Horizontalrüttler mit 80 Bewegungen je min extrahiert.
- Nach Abschluß der Extraktion wurde der Auszug filtriert.

#### **3.1.1.1.1 Gewinnung des Propolistrockenextraktes**

Der zur Herstellung der Testlösungen nötige Propolistrockenextrakt wurde durch Exsikkation des filtrierten Propolisextraktes im Trockenschrank gewonnen. Vom filtrierten Extrakt wurden jeweils 10 ml in zuvor gewogene und markierte Glaspetrischalen mit dem Durchmesser von 10 cm gegeben. Im Trockenschrank erfolgte bei 50°C eine Exsikkation bis zum Verbleiben eines nicht klebrigen Belages. Dieser Belag wurde aus den Petrischalen herausgekratzt und stellte den für die Untersuchungen verwendeten Propolistrockenextrakt dar.

Eine mengenmäßige Bestimmung des gewonnenen Belages wurde durchgeführt und der prozentuelle Gehalt der gelösten Propolis im Propolisethanolextrakt berechnet.

#### **3.1.1.1.2 Herstellung der Propoliszubereitungen**

Zwei Gruppen an Otitis externa erkrankter Hunde (Gruppe Nr. 1 in der Umgebung von Berlin, Land Brandenburg, Gruppe Nr. 2 in Veitshöchheim, Freistaat Bayern) wurden lokal mit zwei propolishaltigen Zubereitungen behandelt, deren Herstellung im folgenden erläutert wird.

##### **Zubereitung Nr. 1**

Die zur Herstellung dieser Zubereitung benutzte Propolis wurde im August 1995 gesammelt. Die Extraktion der Propolis mit 70%igem Ethanol sowie die Gewinnung des Propolistrockenextraktes erfolgte nach den beschriebenen Methoden. Der gewonnene Propolistrockenextrakt wurde in 70%igem Ethanol gelöst. Diese Lösung, die 140 mg Propolistrockenextrakt je ml enthielt, wurde unter 3.2.1 auch auf die Wirkung gegen anaerobe Erreger überprüft. Die Konzentration des Propolistrockenextraktes in der Zubereitung betrug 7%. Um ein leichtes Verbringen der Zubereitung in den äußeren Gehörgang zu ermöglichen und gleichzeitig eine hohe Haft- und Netzfähigkeit sowie eine ausreichende Verfügbarkeit der Propolisbestandteile zu gewährleisten, wurde Rizinusöl als Trägermedium verwendet. Beim Vermischen der Propolislösung mit Rizinusöl im benutzten Verhältnis bildete sich eine stabile Emulsion mit gelbbraunlicher Färbung. Die Emulsion wurde in verschließbaren Flaschen aus braunem Glas bei Zimmertemperatur gelagert.

##### **Zubereitung Nr. 2**

Zur Herstellung der Zubereitung Nr. 2 wurde rumänische Propolis verwendet. Die Propolisextraktion sowie die Gewinnung des Propolistrockenextraktes erfolgte mit dem gleichen Extraktionsmittel, in gleichen Schritten und Verfahren wie bei Zubereitung Nr. 1. Als Trägermedium der Zubereitung Nr. 2 wurde Glycerin verwendet. Eine Beimengung des

gewonnenen Propolistrockenextraktes in das Glycerin fand bis zur Konzentration von 10% im entstandenen Stoffgemisch statt.

### **3.1.1.2 Geräte**

Geräte für Propolisextraktion und zur Herstellung der Propolistestlösungen:

Erlenmeyerkolben, Glasflaschen und -petrischalen	(Werk für Technisches Glas Ilmenau)
Horizontalrüttler THYS 1 & 2	(ILM Labor)
Trockenschrank BST 5010	(MLW)
Wasserbad WB 1000	(Jenaer Glas)
Analysewaage "Basic"	(Sartorius)

### **3.1.1.3 Patientenmaterial**

Um die alleinige Wirkung der Propoliszubereitungen exakt nachzuweisen, befanden sich in beiden Gruppen im Verlauf der lokalen Therapie keine Patienten unter systemischer Behandlung mit Chemotherapeutika und/oder Kortikosteroiden.

#### **Gruppe Nr. 1**

Bei der Auswahl des Patientenmaterials der ersten Gruppe, deren Behandlung mit der Propoliszubereitung Nr. 1 erfolgte, wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

Die Manifestation der Otitis externa lag länger als 3 Wochen zurück. Ausgehend von der ausgewerteten Literatur ist eine Therapie chronischer Otitis externa-Fälle schwieriger als bei akuten Fällen.

Die Patienten waren mindestens 7 Wochen vor Beginn der Propolisbehandlung nicht mit Chemotherapeutika und/oder Kortikosteroiden behandelt worden.

Bei den erkrankten Tieren der 1. Gruppe handelte es sich um 14 Rüden und 6 Hündinnen im Alter von 2,5 bis 12,5 Jahren. Die Angaben über Anzahl, Geschlecht und Rasse der Hunde sind in Tabelle 7, das Alter der Patienten in Tabelle 11 enthalten.

Ein Teil der Patienten (12 Hunde) stammte aus einer Hundevermietung für Wachdienste. Hieraus resultiert die Dominanz der Dienstgebrauchshunde bei der rassenmäßigen Zusammensetzung der ersten Patientengruppe. Die restlichen 8 Hunde waren Privatpatienten in häuslicher Haltung.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Patientengruppe Nr. 1**

Rasse	männlich	weiblich	Summe
Deutscher Schäferhund	7	2	9
Mischling	2	4	6
Kaukasischer Schäferhund	1	-	1
Malinois	1	-	1
Mops	1	-	1
Riesenschnauzer	1	-	1
Amerikanischer Cocker Spaniel	1	-	1
Summe	14	6	20

**Gruppe Nr. 2**

Die Dauer des Bestehens der Otitiden bei den Patienten der zweiten Gruppe lag in einigen Fällen unter drei Wochen.

Einige Patienten dieser Gruppe standen zum Zeitpunkt der Vorstellung unter erfolgloser lokaler Behandlung mit handelsüblichen Kombinationspräparaten.

Die zweite Patientengruppe umfaßte 31 Hunde mit beidseitiger Otitis externa, die in einer Tierarztpraxis in Veitshöchheim, Krs. Würzburg (Freistaat Bayern) mit der Propoliszubereitung Nr. 2 behandelt wurden. Die Tiere stammten aus Einzelhaltungen, ihre Alters- und Rassenzusammensetzung war breit gefächert.

**3.1.1.4 Klinische Untersuchungen und Ausgangsbefunde**

Die Vorstellung der Patienten aus beiden Gruppen durch die Besitzer erfolgte aufgrund folgender Symptome: verstärktes Kopfschütteln, Juckreiz, übler Geruch aus den Ohren, Kratzen an den Ohren mit anschließendem Beriechen der Pfoten, Rötung der Haut im Ohr sowie Ausfluß aus den Ohren.

Alle Patienten aus beiden Gruppen wurden bei ihrer Erstvorstellung klinisch untersucht. Bei der Vorstellungsuntersuchung wurden bei den Patienten außer den Otitiden keine Anzeichen für andere Erkrankungen festgestellt. Alle Patienten wiesen einen guten Ernährungszustand auf.

Eine bakteriologische und mykologische Untersuchung der Otitis externa-Fälle konnte nur in der ersten Gruppe durchgeführt werden, da die Patienten der zweiten Gruppe im Rahmen der Alltagspraxis behandelt wurden.

Von jedem Patienten der ersten Gruppe wurden Rasse, Alter, Geschlecht und sonstige Merkmale des Signalements notiert. Um eine bessere Übersicht über den Verlauf der Behandlung zu geben, wurde nachfolgend jedem Patienten eine feststehende Nummer zugeordnet (Tabelle 8).

Durch die Befragung der Patientenbesitzer sowie Einsicht in die Behandlungskarteien (Hundevermietung) konnte festgestellt werden, daß kein Hund der ersten Gruppe zum Zeitpunkt der Vorstellung unter medikamentöser Behandlung stand.

In einem Teil der Fälle war eine ätiologische Abklärung der Otitiden möglich. Einige Erkrankungen resultierten aus Komplikationen nach Grannenverletzungen wie z.B. Patient Nr. 19, andere aus nicht sachgemäßem Reinigen der Gehörgänge durch Patientenbesitzer wie z.B. Patient Nr. 3. Bei Patient Nr. 18 bestand die beidseitige rezidivierende Otitis externa seit dem Welpenalter. Patienten mit Rezidiven nach vorhergehenden abgeschlossenen Behandlungen waren ebenfalls vertreten. Das Entstehen der beidseitigen Otitis externa von Patient Nr. 11 lag vermutlich in einer Reizung des Gehörgangepithels durch aggressive Stäube, da der Hund zum Bewachen von Baumaterial auf Baustellen sowie von Bauschutt Müllkippen verwendet wurde.

Die spezielle Untersuchung der Ohren erfolgte zunächst zur Feststellung des Ausgangsbefundes und als Verlaufsuntersuchung zur Feststellung des Behandlungserfolges.

Mit Hilfe einer stiftförmigen Untersuchungsleuchte wurde zuerst eine Beurteilung der Ohrumgebung, der Ohrmuschel sowie des einsehbaren Teiles des äußeren Gehörganges vorgenommen. Anschließend wurden die tieferen Teile des äußeren Gehörganges otoskopisch untersucht, zuvor wurden bei Bedarf die Gehörgänge mit Watteohrreinigern gereinigt.

Die Verlaufsuntersuchungen erfolgten in der ersten Patientengruppe jeweils nach 3, 7, 10 und 14 Behandlungen. In der zweiten Patientengruppe nach 7 und 14 Behandlungen.

Um ein vollständiges Bild von der Erkrankung der Patienten der ersten Gruppe bis zur Genesung im Behandlungsverlauf zu zeigen, erfolgte eine ausführliche Dokumentation der bei den speziellen Untersuchungen erhobenen Befunde während der Vorstellung und im Verlauf der Therapie. Hierbei wurden Einzelheiten, wie die Cerumenbeschaffenheit und die entzündliche Rötung des Gehörgangepithels für jeden einzelnen Fall der Otitis externa der ersten Gruppe dokumentiert.

Bei der Vorstellungsuntersuchung der Patienten beider Gruppen wurden in allen Fällen eine ausgeprägte Otitis externa diagnostiziert. Anzeichen für andere Erkrankungen wurden nicht festgestellt. In der ersten Gruppe waren bei einigen Patienten folgende zusätzliche Befunde

auffällig. Die Patienten Nr. 3, 18 zeigten beidseitig eine schuppig veränderte Haut der Ohrmuschel sowie des einsehbaren Teiles des äußeren Gehörganges. Das Haar der Patienten Nr. 4 und 5 war in der Ohrumgebung verklebt und feucht, auffallend war ein übler Geruch aus den Ohren dieser Hunde sowie bei Patient Nr. 19.

Bei der Untersuchung des Patienten Nr. 11 fiel ein stumpfes Haarkleid sowie eine mit trockenen Krusten bedeckte gesamte Hautoberfläche auf.

Die Körpertemperatur lag bei allen Hunden im Normbereich.

#### **3.1.1.4.1 Beurteilung der Cerumenbeschaffenheit**

Die Beurteilung des Cerumens der Patienten der ersten Gruppe erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Die Menge des Cerumens wurde mit 0, 1, 2 bewertet.
  - 0 Epithel des Gehörganges frei oder mit minimalen Cerumenmengen behaftet.
  - 1 Die den äußeren Gehörgang auskleidende Haut ist ohne vorhergehende Reinigung adspektierbar.
  - 2 Das Lumen des Gehörganges ist mit Cerumenmassen ausgefüllt, eine Adspektion ist erst nach vorhergehender Reinigung möglich.
2. Die Konsistenz des Cerumens wurde folgendermaßen bezeichnet: bröckelig (brö.), cremig (kr.), zähflüssig (zfl.), flüssig (fl.).
3. Die Farbe des Cerumens wurde mit schwarz (sch.), braun (br.) oder eitrig-gelb (ge.) angegeben.
4. Eine Abnormität des Cerumengeruches wurde vermerkt.

In den Gehörgängen der an Otitis externa erkrankten Hunde lagen vermehrte Mengen an Cerumen vor. Die Cerumenkonsistenz der erkrankten Hundeohren war in der Mehrzahl der Fälle cremig bis flüssig. Bei drei Hunden war ein veränderter Geruch des Cerumens manifest.

Die Ergebnisse der Ohrcerumenbeurteilung sind aus Tabelle 8 ersichtlich.

**Tabelle 8: Cerumenbeurteilung der ersten Patientengruppe bei Vorstellung**

Lfd. Nr.	Rasse	Rechtes Ohr				Linkes Ohr			
		Menge	Konsist.	Farbe	Geruch	Menge	Konsist.	Farbe	Geruch
1.	Mischling	1	kr.	br.	-	0	-	-	-
2.	Mischling	0	-	-	-	2	brö.	br.	-
3.	Mischling	2	brö.	br.	-	2	brö.	br.	-
4.	Mischling	1	fl.	ge.	+	1	fl.	ge.	+
5.	Mischling	1	fl.	ge.	+	1	zfl.	ge.	+
6.	Mischling	1	kr.	br.	-	2	kr.	br.	-
7.	Deutscher Schäferhund	1	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
8.	Deutscher Schäferhund	1	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
9.	Deutscher Schäferhund	0	-	-	-	1	kr.	br.	-
10.	Deutscher Schäferhund	1	kr.	br.	-	2	kr.	br.	-
11.	Deutscher Schäferhund	1	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
12.	Deutscher Schäferhund	2	kr.	br.	-	0	-	--	-
13.	Deutscher Schäferhund	1	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
14.	Deutscher Schäferhund	1	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
15.	Deutscher Schäferhund	2	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
16.	Malinois	1	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
17.	Kaukasischer Schäferhund	1	kr.	br.	-	1	kr.	br.	-
18.	Mops	2	brö.	br.	-	2	brö.	br.	-
19.	Amerikanischer Cocker Spaniel	0	-	-	-	1	kr.	br.	+
20.	Riesenschnauzer	2	kr.	sch.	-	2	kr.	sch.	-

1. Menge des Cerumens:

0-Epithel des Gehörganges frei oder mit minimalen Cerumenmengen behaftet.

1-Die den äußeren Gehörgang auskleidende Haut ist ohne vorhergehende Reinigung adspektierbar.

2-Das Lumen des Gehörganges ist mit Cerumenmassen ausgefüllt, eine Adspektion ist nach vorhergehender Reinigung möglich.

2. Konsistenz des Cerumens: bröckelig (brö.), cremig (kr.), zähflüssig (zfl.), flüssig (fl.).

3. Farbe des Cerumens: schwarz (sch.), braun (br.) oder eitrig-gelb (ge.) bezeichnet.

4. Abnormität des Cerumengeruches (+), unveränderter Geruch (-)

### 3.1.1.4.2 Otoskopiebefunde

Während der Vorstellung der Hunde wurde eine otoskopische Untersuchung der tiefen Abschnitte des äußeren Gehörganges und des Trommelfelles durchgeführt.

Die Mehrzahl der Otitis externa-Fälle war durch starke entzündliche Rötung des Gehörgangepithels bis hin zur blutigen Imbibition - 37,1% aller Fälle - gekennzeichnet. Bei 22,9% der Fälle traten bereits Epitheldefekte unterschiedlicher Größe auf, lediglich bei 2,9% der Fälle war eine leichte Rötung des Epithels im äußeren Gehörgang feststellbar.

Die Beurteilung der entzündlichen Rötung des Epithels des äußeren Gehörganges der Patienten zum Zeitpunkt der Vorstellung ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

**Tabelle 9: Otoskopische Befunde des Gehörgangepithels der Patienten der 1. Gruppe zum Zeitpunkt der Vorstellung**

Lfd. Nr.	Rasse	Grad der entzündlichen Rötung des Gehörgangepithels	
		Rechtes Ohr	Linkes Ohr
1.	Mischling	4	0
2.	Mischling	0	4
3.	Mischling	3	3
4.	Mischling	4	4
5.	Mischling	4	4
6.	Mischling	3	3
7.	Deutscher Schäferhund	2	2
8.	Deutscher Schäferhund	2	2
9.	Deutscher Schäferhund	0	3
10.	Deutscher Schäferhund	2	2
11.	Deutscher Schäferhund	2	2
12.	Deutscher Schäferhund	4	0
13.	Deutscher Schäferhund	2	2
14.	Deutscher Schäferhund	3	3
15.	Deutscher Schäferhund	3	2
16.	Malinois	3	2
17.	Kaukasischer Schäferhund	3	3
18.	Mops	3	3
19.	Amerikanischer Cocker Spaniel	0	4
20.	Riesenschnauzer	1	2

0-unveränderte Epidermisfarbe, 1-leichte Rötung, 2-starke Rötung, 3-blutige Imbibition, 4-blutige Imbibition und Epitheldefekte.

### **3.1.1.5 Probenentnahme für die bakteriologische und mykologische Untersuchung**

Um die einzelnen Fälle der Otitis externa differenziert zu erfassen, wurden Ohrtupferproben für die bakteriologische und mykologische Untersuchung entnommen.

Aufgrund der physiologischen Beschaffenheit jeweils eines Gehörganges bei den Patienten Nr. 1, 2, 9, 12 und 19 wurde auf eine Probenentnahme aus den gesunden Gehörgängen verzichtet. Alle 35 Proben aus dem äußeren Gehörgang wurden mittels eines etwa 14 cm langen sterilen Wattetupfers, enthalten im Probenentnahmebesteck (Fa. bio Merieux), entnommen. Nach der Entnahme der Tupferprobe erfolgte das sofortige Verbringen des Tupfers in das sterile Transportmedium. Die so gewonnenen Proben gelangten innerhalb von 3, maximal 18 Stunden zur bakteriologischen und mykologischen Untersuchung.

### **3.1.1.6 Therapiemaßnahmen**

Die Behandlung der Patienten beider Patientengruppen erfolgte beidseitig 1mal täglich lokal bis zur vollständigen Genesung. Patienten mit einseitiger Otitis externa wurden ebenfalls beidseitig behandelt. Vor der Verabreichung der Zubereitung in den Gehörgang erfolgte bei starkem Cerumenausfluß eine mechanische Reinigung des Gehörganges mittels Watteohrreinigern.

#### **Gruppe Nr. 1**

Die Patienten der ersten Gruppe erhielten täglich pro Applikation 1 ml der Zubereitung Nr. 1 in den Gehörgang verabreicht. Zu diesem Zweck wurde die Propoliszubereitung in eine 10 ml fassende Einwegspritze, die mit einem Gummiaufsatz zur Ohreingabe versehen war, verfüllt. Nach der Applikation der Zubereitung erfolgte eine kurze Ohrmassage. Hierbei wurde der Ohrgrund mit Daumen und Ringfinger von außen her umfaßt. Mit kreisförmigen Bewegungen des Daumens und Ringfingers gegeneinander erfolgte eine gleichmäßige Verteilung der Zubereitung auf den gesamten Gehörgang.

#### **Gruppe Nr. 2**

Die Propoliszubereitung Nr. 2 wurde in Kunststofffläschchen zur Ohrbehandlung verfüllt und den Patientenbesitzern ausgehändigt. Die Behandlung der Patienten der zweiten Gruppe erfolgte durch die Besitzer jeweils 1mal täglich mit anschließender Ohrmassage.

### 3.1.2 Ergebnisse

#### 3.1.2.1 Ergebnisse der bakteriologischen und mykologischen Untersuchungen

Die bakteriologische und mykologische Untersuchung erfolgte am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin Standort Mitte.

Hierbei waren 80% der Tupferproben der Patienten bakteriologisch oder mykologisch positiv. Lediglich bei den Patienten Nr. 7 und 8 gelang kein Erregernachweis. *Staphylococcus aureus* stellte mit 14 Isolaten den am häufigsten nachgewiesenen Erreger dar. *Clostridium perfringens* wurde 12mal ausschließlich aus Proben von Patienten aus der Hundevermietung isoliert. Weiterhin konnten folgende Erreger diagnostiziert werden: *Streptococcus canis*, *Staphylococcus intermedius*, *Actinomyces* sp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* sp. und *Prevotella bivia*. Aus dem Spektrum der mykologischen Erreger wurde *Malassezia pachydermatis* nachgewiesen.

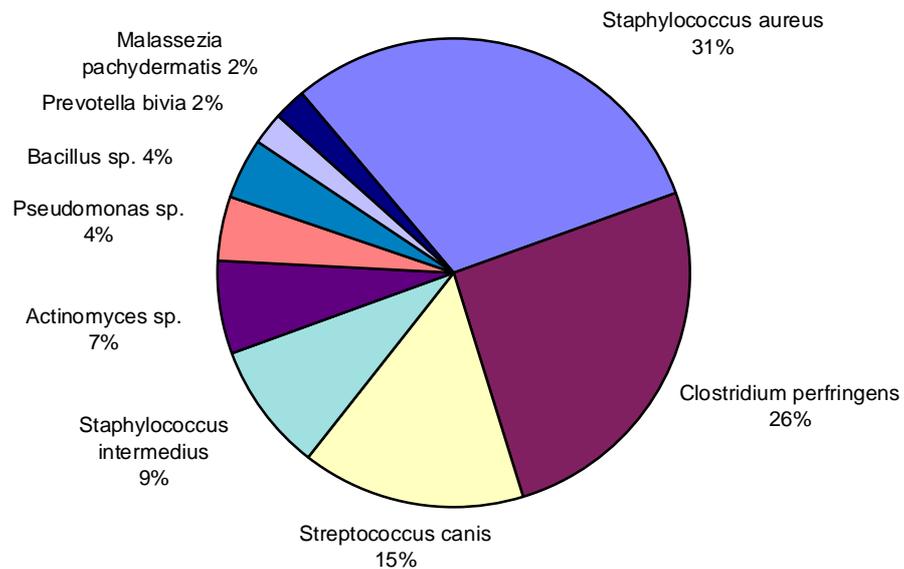
Das isolierte Erregerspektrum ist in Tabelle Nr. 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Aus Tupferproben der ersten Patientengruppe (20 Hunde) isoliertes bakteriologisches und mykologisches Erregerspektrum

Erregerspektrum	Anzahl der Isolate
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
<i>Clostridium perfringens</i>	12
<i>Streptococcus canis</i>	7
<i>Staphylococcus intermedius</i>	4
<i>Actinomyces</i> sp.	3
<i>Bacillus</i> spp.	2
<i>Pseudomonas</i> sp.	2
<i>Prevotella bivia</i>	1
<i>Malassezia pachydermatis</i>	1
Summe der Isolate	46

Die prozentuellen Anteile gleicher Erregerarten an der Gesamtheit des aus 35 Tupferproben isolierten bakteriologischen und mykologischen Erregerspektrums der Otitis externa des Hundes sind in der Abbildung 1 dargestellt.

**Abbildung 1: Bakteriologisches und mykologisches Erregerspektrum der Otitis externa des Hundes, isoliert aus 35 Tupferproben (in Prozent)**



Die Auswertung des isolierten Erregerspektrums ergab, daß in der Mehrzahl der Fälle (57,1%) Mischkulturen vorlagen, wobei Kombinationen von Staphylokokken mit Streptokokken gehäuft vorkamen. Auffallend breit gefächert waren die Mischkulturen der Patienten Nr. 4 und 5, deren Cerumen eine flüssige Konsistenz aufwies. In 42,9% aller Fälle wurden Reinkulturen von Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens oder Pseudomonas sp. isoliert. Einen Überblick über das isolierte Erregerspektrum der einzelnen Otitispatienten der ersten Gruppe gibt Tabelle 11.

**Tabelle 11: Isoliertes Erregerspektrum jedes einzelnen Patienten der ersten Gruppe**

Lfd. Nr.	Rasse	Alter in Jahren	Rechtes Ohr	Linkes Ohr
1.	Mischling	3	Staphylococcus aureus	nicht untersucht
2.	Mischling	6,5	nicht untersucht	Staphylococcus aureus, Streptococcus canis
3.	Mischling	2,5	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus
4.	Mischling	5	Staphylococcus aureus, Streptococcus canis, Actinomyces sp., Bacillus spp., Prevotella bivia	Staphylococcus aureus,  Actinomyces sp., Bacillus spp.
5.	Mischling	3	Staphylococcus aureus, Streptococcus canis, Actinomyces sp.	Staphylococcus aureus, Streptococcus canis
6.	Mischling	7	Staphylococcus aureus, Streptococcus canis	Staphylococcus aureus, Streptococcus canis
7.	Deutscher Schäferhund	3	kein Erregernachweis	kein Erregernachweis
8.	Deutscher Schäferhund	3,5	kein Erregernachweis	kein Erregernachweis
9.	Deutscher Schäferhund	4	nicht untersucht	Clostridium perfringens
10.	Deutscher Schäferhund	2,5	Clostridium perfringens	Clostridium perfringens
11.	Deutscher Schäferhund	3,5	Clostridium perfringens	kein Erregernachweis
12.	Deutscher Schäferhund	3,5	Clostridium perfringens, Staphylococcus intermedius	nicht untersucht
13.	Deutscher Schäferhund	9,5	Clostridium perfringens	Clostridium perfringens, Staphylococcus intermedius
14.	Deutscher Schäferhund	12,5	Streptococcus canis	Clostridium perfringens
15.	Deutscher Schäferhund	4	Clostridium perfringens, Staphylococcus intermedius	Staphylococcus aureus
16.	Malinois	3	kein Erregernachweis	Clostridium perfringens
17.	Kaukasischer Schäferhund	9	Clostridium perfringens, Pseudomonas sp.	Clostridium perfringens
18.	Mops	2,5	Staphylococcus aureus, Malassezia pachydermatis	Staphylococcus aureus
19.	Amerikanischer Cocker Spaniel	5	nicht untersucht	Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius
20.	Riesenschnauzer	5	Pseudomonas sp.	kein Erregernachweis

### 3.1.2.2 Therapieergebnisse

Von insgesamt 97 Otitis externa-Fällen wurden nach 14 Behandlungen 94 Fälle geheilt. Bemerkenswert an der Therapie der Otitis externa mit den Propoliszubereitungen war, daß sich bei konsequenter Einhaltung des Therapieplanes die Therapiedauer in beiden Patientengruppen auf 2 Wochen beschränkte. Desweiteren waren bei Patienten der ersten Gruppe, die drei Monate lang nach erfolgreicher Behandlung unter Beobachtung standen, keine Rezidive zu verzeichnen. Durch die im Verlauf der Behandlung durchgeführten Untersuchungen konnte für die Tiere der ersten Gruppe ein lückenloser Therapieverlauf erstellt werden. Die otoskopisch erhobenen Befunde dieser Verlaufsuntersuchungen sowie der Ausgangsbefunde sind in Tabelle 12 zusammengefaßt wiedergegeben.

**Tabelle 12: Otoskopische Befunde der Patienten der ersten Gruppe im Behandlungsverlauf**

Lfd. Nr.	Otoskopische Befunde des Gehörgangepithels									
	Ausgangsbefund		nach 3 Behandlungen		nach 7 Behandlungen		nach 10 Behandlungen		nach 14 Behandlungen	
	rechtes Ohr	linkes Ohr	rechtes Ohr	linkes Ohr	rechtes Ohr	linkes Ohr	rechtes Ohr	linkes Ohr	rechtes Ohr	linkes Ohr
1.	4	0	Schorf 1	0	Schorf 0	0	Schorf 0	0	0	0
2.	0	4	0	Schorf 1	0	Schorf 0	0	Schorf 0	0	0
3.	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0
4.	4	4	4	4	4	4	Schorf 1	Schorf 1	Schorf 0	Schorf 0
5.	4	4	4	4	4	4	4	Schorf 2	4	Schorf 0
6.	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0
7.	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
8.	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
9.	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0
10.	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
11.	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
12.	4	0	Schorf 1	0	Schorf 0	0	Schorf 0	0	0	0
13.	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
14.	3	3	1	2	0	0	0	0	0	0
15.	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0
16.	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0
17.	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0
18.	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0
19.	0	4	0	Schorf 1	0	Schorf 0	0	Schorf 0	0	0
20.	1	2	1	2	1	2	1	0	0	0

0-physiologischer Befund, 1-leichte Rötung, 2-starke Rötung, 3-blutige Imbibition, 4-blutige Imbibition und Epitheldefekte.

Eine Abheilung der meisten Otitis externa-Fälle (79) war im Verlauf der ersten sieben Therapietage zu verzeichnen. Bei Patienten mit festem bis cremigem Cerumen verlief die Heilung, wie die Daten der ersten Patientengruppe zeigen, über einen kürzeren Zeitraum als bei Patienten mit flüssigem Cerumen.

In beiden Behandlungsgruppen trat bei Patienten mit starkem Juckreiz im Durchschnitt nach der dritten Behandlung eine deutliche Verringerung des Juckreizes ein.

Eine deutliche Abnahme der entzündlichen Veränderungen des Epithels der äußeren Gehörgänge war bei den Patienten beider Behandlungsgruppen ebenfalls nach drei Behandlungen zu beobachten. In der ersten Patientengruppe trat bereits nach 3tägiger Therapie mit der Propoliszubereitung Nr. 1 in der Mehrzahl der Otitis externa-Fälle (31 Fälle oder 88,7%), eine wesentliche Besserung ein. In einem Fall sogar Heilung. Lediglich 4 Fälle (11,3%) zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keinen therapeutischen Einfluß.

Nach 7tägiger Therapie wurde in 29 Fällen (82,9%) die vollständige Heilung erreicht. Bei den nachfolgenden Untersuchungen bis zum 14. Behandlungstag stieg die Heilungsquote weiter, so daß zum Abschluß der Behandlung lediglich in einem Fall kein Erfolg zu verzeichnen war. Die Heilungsquoten in der 1. Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten zeigen den Heilungsverlauf in der Tabelle 13 innerhalb der 14tägigen Propolistherapie an.

**Tabelle 13: Heilungsverlauf und Heilungsquoten der 1. Gruppe, beurteilt nach dem Grad der entzündlichen Veränderungen des Gehörgangepithels**

Grad der Rötung	Vor der Behandlung		Nach 3 Behandlungstagen		Nach 7 Behandlungstagen		Nach 10 Behandlungstagen		Nach 14 Behandlungstagen	
	Anzahl der Fälle	%	Anzahl der Fälle	%	Anzahl der Fälle	%	Anzahl der Fälle	%	Anzahl der Fälle	%
0	-	-	1	2,9	29	82,9	30	85,7	34	97,1
1	1	2,9	18	51,4	1	2,9	3	8,5	-	-
2	13	37,1	12	34,4	1	2,9	1	2,9	-	-
3	13	37,1	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	22,9	4	11,3	4	11,3	1	2,9	1	2,9
Total	35	100	35	100	35	100	35	100	35	100

0-physiologischer Befund, 1-leichte Rötung, 2-starke Rötung, 3-blutige Imbibition, 4-blutige Imbibition und Epitheldefekte.

### 3.1.2.2.1 Wirkungsvergleich beider Propoliszubereitungen

Von den 20 mit der Propoliszubereitung Nr. 1 lokal behandelten Hunden zeigten 17 nach einer Woche Therapie eine vollständige Genesung. Weitere 2 Hunde genasen nach 14 Tagen. Bei einem Hund mit beidseitiger Otitis externa trat nach 2 Wochen eine Ausheilung der Erkrankung auf einem Ohr und auf dem anderen Ohr eine Besserung des Zustandes ein. Nach insgesamt 4wöchiger Behandlung war auch dieses Ohr abgeheilt.

Bei der Behandlung von 31 Hunden der 2. Gruppe mit beidseitiger Otitis externa mit der Propoliszubereitung Nr. 2 wurden die folgenden Ergebnisse erzielt. Nach sieben Tagen Behandlung genasen 25 Patienten, nach einer weiteren Woche zeigten weitere 5 Patienten eine vollständige Ausheilung. Bei einem Patienten blieb die Behandlung erfolglos.

In Tabelle 14 sind die Heilungsquoten beider Gruppen zusammengefaßt.

**Tabelle 14: Heilungsquoten der Otitis externa-Fälle in beiden Patientengruppen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer in %**

	Behandlungsdauer		
	3 Tage	7 Tage	14 Tage
Gruppe 1	2,86%	82,86%	97,14%
35 Fälle	1	29	34
Gruppe 2	nicht ermittelt	80,65%	96,77%
62 Fälle	nicht ermittelt	50	60
Gesamt	nicht ermittelt	81,44%	96,90%
97 Fälle	nicht ermittelt	79	94

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich die Heilungsverläufe sowie die Heilungsraten der Otitis externa-Fälle in beiden Gruppen sehr ähnelten. So betrug die Heilungsrate nach einer 7maligen Behandlung in der ersten Gruppe 82,86%, in der zweiten Gruppe 80,65%, nach einer 14maligen Behandlung entsprechend 97,14% und 96,77%.

In beiden Gruppen waren insgesamt nach 7 Tagen 81,44% und nach 14 Tagen 96,9% der Fälle ausgeheilt.

### 3.1.2.2.2 Beobachtungen während der Therapie

Rizinusöl bzw. Glycerin erwiesen sich als Arzneistoffträger beider Propoliszubereitungen gut geeignet. Der Aggregatzustand beider Propoliszubereitungen ermöglichte deren leichtes Verbringen in die Gehörgänge. So konnte nach der anschließenden Ohrmassage, eine Verteilung

der Zubereitung auf der gesamten Oberfläche des Epithels der Gehörgänge erreicht werden. Hierbei bildete sich ein Film auf der Oberfläche des Epithels, der eine hohe Haftung aufwies.

Die wiederholte Applikation der Propoliszubereitungen wurde von den Patienten ohne Abwehrreaktionen geduldet.

Bei den behandelten Patienten beider Gruppen wurden keinerlei allergische Reaktionen und Nebenwirkungen auf die propolishaltigen Zubereitungen beobachtet.

Die Patientenbesitzer standen der Therapie mit den Propoliszubereitungen aufgeschlossen gegenüber. Sie bewerteten die einmalige tägliche Applikation der Zubereitung positiv im Vergleich zu der oft dreimaligen Applikation üblicher Präparate. Den Propolisgeruch der Zubereitungen empfanden die Patientenbesitzer als angenehm.

Bei Patienten beider Gruppen, aus deren Ohren ein übler Geruch ausströmte, war nach der ersten Behandlung eine Intensitätsminderung dieses Geruches festzustellen.

## **3.2 Untersuchung der Wirkung von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt auf Bakterien, Pilze und Hefen**

### **3.2.1 Material und Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf anaerobe Bakterien**

#### **3.2.1.1 Propolistrockenextrakt**

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die gleiche Propolis verwendet wie zur Behandlung der Otitis externa in der ersten Patientengruppe. Die Herstellung des Propolistrockenextraktes und der Propolistestlösung erfolgte nach den unter 3.1.1.1 angeführten Methoden. Für die Untersuchungen wurde eine Propolistestlösung mit 140 mg Propolistrockenextrakt je ml verwendet.

#### **3.2.1.2 Anaerobe Bakterienstämme**

Die Auswahl der anaeroben Erreger erfolgte nach klinischer Relevanz mit Blick auf eine Einsatzmöglichkeit einer Propoliszubereitung.

Durch die in der Literatur beschriebenen positiven Erfahrungen des Propoliseinsatzes bei der Therapie der Nekrobazillose der Klauen und der Moderhinke war es interessant, die Wirkung von Propolis auf Erreger, die zum Spektrum der Dermatitis digitalis des Rindes zählen, zu testen. Diese Erkrankung ist eine infektiöse Entzündung der Haut im Bereich des Zwischenklauenspaltes. Bei den erkrankten Tieren kommt es zu Lahmheiten, Störungen des Allgemeinbefindens und Leistungsabfall. Durch ihre hohe Kontagiosität verursacht diese Erkrankung vor allem in westeuropäischen Großbeständen bedeutende Verluste.

Ein Teil der in den Untersuchungen verwendeten Erreger wurde aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin Standort Mitte zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um 9 Isolate, gewonnen aus Bioptaten von Dermatitis digitalis-Läsionen bei Rindern. Weitere 5 anaerobe Erregerstämme, die bei der mikrobiologischen Untersuchung der Propolis verwendet wurden, stammten aus laufenden diagnostischen Untersuchungen der Bioptate von an Dermatitis digitalis erkrankten Rindern. Eine Übersicht über die Spezies und Herkunft der verwendeten Bakterienstämme gibt Tabelle 15.

**Tabelle 15: Verwendete Bakterienstämme von der Dermatitis digitalis des Rindes**

Spezies	Stamm-Nummer
Porphyromonas levii	1136/1, 1127/3, 1137/1, 1128/1
Prevotella denticola	1146/2
Peptostreptococcus anaerobius	1127/4
Fusobacterium nucleatum	1115/6
Fusobacterium necrophorum	1127/1, 1121/1
Porphyromonas levii	
Porphyromonas levii	
anaerobe Kokken	
Fusobacterium nucleatum	
Prevotella sp.	

### 3.2.1.3 Nährböden

Für die Untersuchungen der Propoliswirkung auf anaerobe Bakterien wurde Columbia Agar und das flüssige Nährmedium Brain Heart Infusion (BHI) verwendet. Die Nährböden wurden nach folgenden Rezepturen angefertigt:

Nährmedium	Rezeptur		
Columbia Agar	Columbia Agar	(bio Merieux)	1000 ml
	L-Cysteinumchlorid	(Merck)	0,3 g
	Hämin	(Fluka AG)	0,005 g
	Konaktion (Vit. K1)	(Hoffmann La Roche)	10 mg
	lysiertes Hammelblut		5 ml
	defibriniertes Hammelblut		50 ml
BHI	Brain Heart Infusion	(Serva)	1000 ml
	Hefeextrakt	(Serva)	5 g
	L-Cysteinumchlorid	(Merck)	0,3 g
	Hämin	(Fluka AG)	0,005 g
	Konaktion (Vit. K1)	(Hoffmann La Roche)	10 mg

### 3.2.1.4 Untersuchung der Propolistrockenextraktwirkung auf anaerobe Bakterien

Die Untersuchung der antibakteriellen Wirkung des Propolistrockenextraktes auf anaerobe Erreger erfolgte im Dilutionstest.

Während der Anfertigung der Nährböden wurde die Propolistestlösung in die 50°C warmen Nährböden in einem solchen Volumen zugeführt, daß die Endkonzentrationen von Propolistrockenextrakt 0,1 mg, 0,5 mg und 1 mg/ml Nährboden betragen. Die noch flüssigen Nährböden wurden zu je 10 ml in Petrischalen ausgegossen und für 24 h zum Abdampfen des Lösungsmittels in den Brutschrank verbracht, anschließend erfolgte die Beimpfung mit den

jeweiligen Erregern. Flüssige Nährböden wurden zu je 2 ml in Röhren ausgegossen und nach Abkühlung mit den jeweiligen Keimen beimpft.

Die Herstellung der Bakterien suspensionen zur Beimpfung der Nährböden erfolgte in folgenden Schritten: Aus Reinkulturen der verwendeten Erreger wurden mittels einer sterilen Impflohe Kolonien entnommen und in 5 ml steriler isotoner Kochsalzlösung suspendiert. Durch Verdünnung oder Zugabe weiterer Kolonien wurde die Trübung dieser Suspension auf 4 der Standardskala nach McFarland eingestellt. Von den so hergestellten Suspensionen wurden 10 µl je Röhren bzw. Petrischale verbracht. Auf festen Nährböden wurde der aufgebrauchte Tropfen mit sterilem Glasspatel ausgestrichen. Die beimpften Medien wurden in Anaerobiertöpfe verbracht, die Luft evakuiert, und das Vakuum mit Nelson Gas aufgefüllt. Der Vorgang der Evakuierung und Auffüllung mit Nelson Gas erfolgte insgesamt viermal. Bei anaeroben Verhältnissen veränderte sich innerhalb von 2-3 h die Farbe des beigefügten Indikators BR 55. Sofort nach der Beimpfung erfolgte die Inkubation unter anaeroben Bedingungen über einen Zeitraum von 2 bis 4 Tagen bei 37°C.

#### **3.2.1.4.1 Bestimmung der minimalen hemmenden Konzentration (MHK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien**

In flüssigen Nährböden wird die Bakterienvermehrung durch Trübung, Kahlhautbildung und Bodensatzbildung sichtbar. Auf festen Nährböden ist das Wachstum der Erreger an Bildung von Kolonien erkennbar.

Als minimale hemmende Konzentration (MHK) einer Substanz wird die geringste der getesteten Konzentration dieser Substanz im Nährboden bezeichnet, bei der es nach Inkubation zu keinem makroskopisch sichtbaren Wachstum der getesteten anaeroben Erreger kommt.

#### **3.2.1.4.2 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien**

Die Bestimmung der minimalen Konzentration von Propolistrockenextrakt im flüssigen Nährboden, die für eine bakterizide Wirkung erforderlich ist, wurde in folgender Weise vorgenommen. Aus flüssigen Nährböden, in denen durch die zugesetzte Propoliskonzentration das Wachstum der anaeroben Erreger inhibiert war, erfolgten Direktausstriche auf Columbia Agar-Platten. Diese wurden unter anaeroben Bedingungen für 2 bis 4 Tage bei 37°C inkubiert.

Die niedrigste der getesteten Konzentrationen von Propolistrockenextrakt im flüssigen Nährboden, die zu dem vollständigen Ausbleiben des Wachstums des anaeroben Erregers auf

den Columbia Agar-Platten führte, wurde als minimale bakterizide Konzentration (MBK) bezeichnet.

## **3.2.2 Material und Methoden des antibakteriellen und antimykotischen Wirksamkeitsvergleiches von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt**

### **3.2.2.1 Propolis und Pappelknospen**

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Propolis des gleichen Standortes (vgl. 3.1.1.1) verwendet. Die Pappelknospen wurden im Umkreis von ca. 500 m dieses Standortes gesammelt.

#### **Gewinnung von Frühjahrspropolis und Pappelknospenharz**

Durch das auf den Frühling beschränkte Auftreten von deutlich sichtbaren und leicht gewinnbaren Absonderungen der Pappelknospen war es notwendig, eine Begrenzung des Sammelzeitraumes dieser Absonderungen durch die Bienen vorzunehmen.

Um eine Probe reiner Frühjahrspropolis zu gewinnen, wurden die Beuten im März mit neuen Wabenrähmchen ausgestattet, welche von den Bienen mit frischer Propolis überzogen wurden.

Die Frühjahrspropolis wurde am 01. Mai 1994 gewonnen.

Die so gewonnene Propolis enthält mutmaßlich gleiche Wirkstoffe wie Pappelknospenharz vom gleichen Standort und kann deswegen zu einem antibakteriellen und antimykotischen Wirksamkeitsvergleich von Propolis und Pappelknospenharz gleicher Provenienz verwendet werden.

Die Pappelknospen wurden im Umkreis von ca. 500 Metern vom Standort der Beuten von *Populus italica* gesammelt.

#### **Pappelknospen- und Propolisextraktion**

Unmittelbar nach dem Sammeln erfolgte eine 10tägige Extraktion der unzerkleinerten Pappelknospen bei einer Temperatur von 25°C mit 70%igem Ethanol (Fa. Alkohol Handels Kontor) in verschlossenen Glasbehältnissen.

Die Extraktion des Propolispulvers erfolgte ebenfalls mit 70%igem Ethanol bei 25°C über einem Zeitraum von 10 Tagen. Nach Extraktion wurden beide Extrakte durch Papierfilter filtriert. Die Gewinnung beider Trockenextrakte erfolgte im gleichen Verfahren wie unter 3.1.1.1 beschrieben. Danach erfolgte eine Bestimmung der Menge an gelöster Propolis und gelösten Pappelknospenharzen im jeweiligen Extrakt.

### **Herstellung der Testlösungen**

Beide gewonnenen Trochenextrakte wurde in 70%igem Ethanol gelöst. Es erfolgte die Herstellung zweier Stammlösungen mit einem Gehalt des Propolistrockenextraktes und des Pappelknospenharztrockenextraktes von jeweils 140 mg/ml.

Bei den Untersuchungen der Propoliswirkung auf anaerobe Bakterien wurde durch das Lösen von Propolistrockenextrakt einer Propolischarge in 70%igem Ethanol eine Stammlösung mit einem Gehalt von 140 mg Propolistrockenextrakt je ml hergestellt.

#### **3.2.2.2 Bakterien- und Pilzstämme**

Bei der Auswahl des bakteriologischen und mykologischen Erregerspektrums spielten zwei Faktoren eine ausschlaggebende Rolle. Zum einen sollten die Erreger zu den wesentlichen Erregerarten der Otitis externa des Hundes zählen, zum anderen sollten die Erreger zu der schon von anderen Autoren mittels Dilutionsverfahren getesteten Palette gehören. Das würde einen Vergleich der früheren mit den zu erzielenden Ergebnissen ermöglichen.

Die mikrobiologischen und mykologischen Vergleichsuntersuchungen beider Substanzen wurden an folgenden, aus veterinärmedizinischem Untersuchungsmaterial isolierten Erregerstämmen durchgeführt.

#### **Bakterien:**

*Staphylococcus aureus*

Infektionen mit Staphylokokken sind bei allen Tierarten anzutreffen und treten häufig als lokale Haut- und Unterhautentzündungen auf. Die größten wirtschaftlichen Einbußen werden durch die *Staphylococcus aureus*-Mastitis des Rindes und Schafes und die *Staphylococcus aureus*-Infektion des Geflügels verursacht. Ausgehend von einer Vielzahl Publikationen wird diesem grampositiven Erreger eine entscheidende Rolle bei der Otitis externa des Hundes bescheinigt.

*Pseudomonas aeruginosa*

Dieser Erreger ruft Wundinfektionen sowie lokal fortschreitende Entzündungsprozesse mit Neigung zu Metastasen hervor. Die blaugrüne oder grüne Verfärbung des Eiters wird durch diesen Keim verursacht. In dem in der Literatur angeführten isolierten gramnegativen Erregerspektrum der Otitis externa des Hundes ist dieser Keim anteilmäßig am häufigsten vertreten.

*Escherichia coli*

In Abhängigkeit von den Virulenzeigenschaften, die assoziiert an tierartspezifische *Escherichia coli* Serotypen sind, verlaufen die Erkrankungen als reine Darminfektionen, als Septikämie und als lokale Infektion.

### **Pilze und Hefen:**

*Malassezia pachydermatis*

Diesem Erreger, einer Hefe, wird eine entscheidende Rolle bei der Otitis externa des Hundes, besonders in chronischen Fällen, zugeschrieben.

*Candida albicans*

Diese Hefe gehört zur Gattung *Candida*, die sogenannten Kandidosen bei Haustieren hervorrufen. Dazu gehören die Hefemastitis des Rindes, die Kandidose des oberen Verdauungstraktes des Schweines nach dem Absetzen und der Soor des Ösophagus und des Kropfes beim Geflügel.

*Trichophyton mentagrophytes*

Klinische Bedeutung hat dieser Mehrwirtsparasit als Erreger von Dermatomykosen und ist unter anderem maßgeblich an der Dermatophytose des Schweines beteiligt.

*Aspergillus fumigatus*

Beim Rind befällt dieser Erreger die Atmungsorgane und verursacht die Aspergillose der Lunge. Beim Befall der trächtigen Gebärmutter des Rindes kommt es zum mykotischen Abort. Die Aspergillose des Geflügels wird ebenfalls durch diesen Erreger hervorgerufen.

### **3.2.2.3 Nährböden**

Beim Wirkungsvergleich von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt fanden in den bakteriologischen Untersuchungen Nähragar 1 (Fa. Sifin), bei den mykologischen Untersuchungen Sabouraud Agar (Fa. Sifin) als Nährböden Anwendung.

### **3.2.2.4 Geräte**

Speziell für die anaerobe Arbeitstechnik wurden gebräuchliche kommerzielle Anaerobiosetechniken verwendet, darunter folgende Geräte:

Anaerobiertöpfe Hp 11 (Oxoid)

Anaerobic Indicator BR 55 (Oxoid)

Exsikkatoren (Werk für Technisches Glas Ilmenau)

### **3.2.2.5 Antibakterieller und antimykotischer Wirksamkeitsvergleich von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt gleicher Provenienz**

Der Vergleich beider Trockenextrakte erfolgte im Agar-Dilutionstest. Hierbei wurden die alkoholischen Lösungen der zu vergleichenden Trockenextrakte in die flüssigen, 50°C warmen Nährböden gemischt und die folgenden Konzentrationen vom jeweiligen Trockenextrakt pro ml Nährboden eingestellt: 0,175 mg, 0,35 mg, 0,7 mg, 1,4 mg und 2,8 mg.

Die Petrischalen wurden mit je 10 ml Nährboden ausgegossen und verblieben zum Zweck des Abdampfens des Lösungsmittels mit geöffnetem Deckel über einen Zeitraum von 72 Stunden bei den bakteriologischen Untersuchungen und 120 Stunden bei den mykologischen Untersuchungen im Brutschrank.

Die Bakteriensuspensionen zum Beimpfen der Nährböden wurde durch Suspendieren aus Reinkulturen entnommener Bakterienkolonien in steriler isotoner Kochsalzlösung hergestellt. Um einen Einfluß der Keimdichte auf den antibakteriellen Effekt beider Substanzen zu überprüfen, wurden drei verschiedene Keimkonzentrationen zur Beimpfung der Nährböden verwendet:  $10^2$ ,  $10^3$ , und  $10^4$  Keime je ml Bakteriensuspension. Von diesen wurden jeweils 0,1 ml je Petrischale aufgebracht und mit sterilem Glasspachtel ausgestrichen.

Bei der Herstellung der Pilzsuspensionen wurden die Hefen und Pilze aus Reinkulturen in steriler isotoner Kochsalzlösung suspendiert. Die Beimpfung der Nährböden erfolgte mit jeweils 0,1 ml Pilzsuspensionen je Petrischale, wobei das Wachstum der Hefen, Dermatophyten und Schimmelpilze im geschlossenen Rasen angestrebt wurde.

Die Auswertung der antibakteriellen Wirkungen beider Substanzen erfolgte nach 24 Stunden Inkubation der beimpften Nährböden. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Bei bakteriellen Erregern wurde ein gehemmtes Keimwachstum im Vergleich zur Kontrolle durch die Verringerung der Kolonienzahl und Größe sichtbar. Durch das Auszählen der gewachsenen Kolonien auf den Nährböden war es möglich, den antibakteriellen Effekt beider Substanzen in allen getesteten Konzentrationen zu vergleichen.

Die Inkubationstemperatur im antimykotischen Wirksamkeitsvergleich betrug bei *Aspergillus fumigatus* 30°C, bei den anderen getesteten Hefen und Pilzen 36°C. Als antimykotische Wirkung wurde zum einen das zeitlich verzögerte Wachstum der Erreger gegenüber den Kontrollen gewertet und zum anderen wurde ein auf die Gesamtfläche bezogenes vereinzelteres Wachstum der Pilze (bei Wachstum im geschlossenen Rasen) im Vergleich zu Kontrollen als

antimykotische Wirkung bewertet. Die Auswertung erfolgte mehrmals im Verlauf der Inkubation nach 2, 5 und 7 Tagen.

Die niedrigste festgestellte Konzentration von Propolis- oder Pappelknospenharztrockenextrakt im Nährboden, die ein vollständiges Ausbleiben des Wachstums der Erreger bewirkte, wurde als minimale hemmende Konzentration (MHK) bezeichnet.

#### **3.2.2.6 Vorversuche**

In Vorversuchen wurde die Wirkung des Lösungsmittels (70%iges Ethanol) auf die anaeroben Erreger sowie die Wirkung des Lösungsmittels (70%iges Ethanol) auf die Bakterien, Pilze und Hefen überprüft. Es wurden gleiche Volumina des Ethanols in die Nährböden verbracht wie dies in den Hauptversuchen geschah.

In den Konzentrationen bis zu 2,5 ml 70%igen Ethanols je 100 ml Nährboden zeigte sich keine Beeinflussung des Wachstums aller untersuchten anaeroben Erreger im Vergleich zur Kontrolle.

Eine Wirkung des Lösungsmittels (70%iges Ethanol) bis zu einer Konzentration von 2% im Nährboden auf alle getesteten Pilze und Hefen sowie auf die Bakterien *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* konnte nicht festgestellt werden. Das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* wurde bei der Zugabe von 2 ml 70%igen Ethanols je 100 ml Agar etwas gehemmt. Dies zeigte sich in einer Verringerung der Anzahl der Kolonien dieser Kultur.

### 3.2.3 Ergebnisse

#### 3.2.3.1 Wirkung von Propolistrockenextrakt auf anaerobe Bakterien

Alle untersuchten anaeroben Bakterienstämme erwiesen sich als empfindlich gegen Propolistrockenextrakt. Der ausgeprägteste antibakterielle Effekt wurde an *Peptostreptococcus anaerobius* festgestellt, wobei bereits eine Konzentration von 0,1 mg Propolistrockenextrakt je ml Nährboden ein gehemmtes Wachstum bewirkte. Bei den übrigen getesteten anaeroben Erregern war in dieser Konzentration keine Wachstumshemmung sichtbar. Bei der Konzentration von 0,5 mg/ml Propolistrockenextrakt/Nährboden wurde eine vollständige Wachstumsinhibierung aller 6 *Porphyromonas levii*-Stämme, von jeweils einem Stamm anaerober Kokken, *Prevotella* sp., *Prevotella denticola* und *Peptostreptococcus anaerobius* ermittelt. Diese Konzentration hemmte das Wachstum aller getesteten Fusobakterien Spezies. Bei der Konzentration von 1,0 mg Propolistrockenextrakt je ml Nährboden trat bei 2 *Fusobacterium necrophorum* und 2 *Fusobacterium nucleatum*-Stämmen eine vollständige Inhibierung des Wachstums ein. Die Gesamtheit der ermittelten Ergebnisse zeigt Tabelle 16.

Bei verschiedenen Stämmen gleicher Spezies wurden keine Unterschiede der Empfindlichkeit gegen Propolistrockenextrakt festgestellt.

Auch im Hinblick auf die unterschiedliche Herkunft gleicher Spezies - aus der Stammsammlung bzw. aus frischem Untersuchungsmaterial - wurden keine unterschiedlichen antibakteriellen Wirkungen des Propolistrockenextraktes sichtbar.

##### 3.2.3.1.1 Minimale hemmende Konzentration (MHK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien

Die minimalen Konzentrationen von Propolistrockenextrakt, die bei den Versuchen vollständig das Wachstum der anaeroben Erreger verhinderten, betragen für 6 *Porphyromonas levii*-Stämme sowie für *Peptostreptococcus anaerobius*, anaerobe Kokken und *Prevotella* sp. 0,5 mg Propolistrockenextrakt je ml Nährboden. Eine MHK von 1,0 mg/ml Propolistrockenextrakt wurde für 2 *Fusobacterium necrophorum*-Stämme und 2 *Fusobacterium nucleatum*-Stämme bestimmt. Unterschiede der minimalen hemmenden Konzentration für gleiche Erregerspezies auf festen oder flüssigen Nährböden wurden nicht ermittelt. Eine Zusammenfassung aller bei den mikrobiologischen Untersuchungen ermittelten MHK gibt Abbildung 3.

### 3.2.3.1.2 Minimale bakterizide Konzentration (MBK) des Propolistrockenextraktes für anaerobe Bakterien

Die Bestimmung der MBK des Propolistrockenextraktes erfolgte an der Erregergruppe, die aus frischem Untersuchungsmaterial von Dermatitis digitalis des Rindes stammte. Hierbei wurde für 2 Porphyromonas levii-Stämme sowie Prevotella sp. und anaerobe Kokken eine MBK von 0,5 mg/ml Propolistrockenextrakt ermittelt. Bei Fusobacterium nucleatum betrug die MBK 1,0 mg/ml Propolistrockenextrakt.

**Tabelle 16: Beeinflussung des Wachstums anaerober Bakterien durch Propolistrockenextrakt**

Lfd. Nr.	Spezies	Stamm Nr.	Konzentration Propolistrockenextrakt (in mg/ml Nährboden)		
			0,1	0,5	1,0
1.	Porphyromonas levii	1136/1	++	-	-
2.	Porphyromonas levii	1127/3	++	-	-
3.	Porphyromonas levii	1137/1	++	-	-
4.	Porphyromonas levii	1128/1	++	-	-
5.	Prevotella denticola	1146/2	++	-	-
6.	Peptostreptococcus anaerobius	1127/4	+	-	-
7.	Fusobacterium nucleatum	1115/6	++	+	-
8.	Fusobacterium necrophorum	1127/1	++	+	-
9.	Fusobacterium necrophorum	1121/1	++	+	-
10.	Porphyromonas levii		++	-	-
11.	Porphyromonas levii		++	-	-
12.	anaerobe Kokken		++	-	-
13.	Fusobacterium nucleatum		++	+	-
14.	Prevotella sp.		++	-	-

- kein Keimwachstum sichtbar
- + im Vergleich zu Kontrollen gehemmttes Wachstum
- ++ ungehemmttes Keimwachstum

### **3.2.3.2 Antibakterieller und antimykotischer Wirksamkeitsvergleich von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt**

Die zur Testung verwendeten Erreger unterschieden sich in ihrer Empfindlichkeit gegen beide getesteten Trockenextrakte. *Staphylococcus aureus* erwies sich am empfindlichsten. Sowohl Propolistrockenextrakt als auch Pappelknospenharztrockenextrakt in einer Konzentration von 0,175 mg/ml hemmten vollständig das Wachstum dieses Erregers. Im Gegensatz dazu wurde bei *E. coli* mit der höchsten getesteten Konzentration von 2,8 mg/ml Propolis- oder Pappelknospenharztrockenextrakt keine Wachstumsinhibition bewirkt.

Der antibakterielle Effekt von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt war bei den getesteten Erregern etwa gleich.

Die Höhe der Keimkonzentration während der Beimpfung der Nährböden hatte keinen Einfluß auf den antibakteriellen Effekt beider Trockenextrakte, so daß für die jeweils drei Keimkonzentrationen eines Erregers gleiche MHK-Werte ermittelt wurden. Die erzielten Ergebnisse der Wirkung beider Substanzen sind im folgenden für jeden einzelnen Erreger gesondert aufgeführt.

#### ***Staphylococcus aureus***

Ab einer Konzentration von 0,175 mg/ml Nährboden bewirkten beide Trockenextrakte ein vollständiges Ausbleiben des Wachstums dieses Erregers. Aus diesem Grund wurde eine noch geringere Konzentration getestet. Die Konzentrationen von 0,0875 mg Propolis- oder Pappelknospenharztrockenextrakt je ml Nährboden hatten keinen Einfluß auf das Wachstum.

#### ***Pseudomonas aeruginosa***

Die antibakterielle Wirkung beider Trockenextrakte zeigte sich ab einer Konzentration von 0,7 mg/ml Nährboden in einer Verringerung der Koloniengröße.

Eine vollständige Wachstumshemmung dieses Erregers wurde für beide Trockenextrakte in den getesteten Konzentrationen bis 2,8 mg/ml nicht festgestellt.

**Escherichia coli**

Im Bereich der getesteten Konzentrationen beider Trockenextrakte von 0,175 bis zu 2,8 mg/ml im Nährboden wurden keine antibakteriellen Wirkungen festgestellt.

Die getesteten Mycel- und Sproßpilze reagierten erwartungsgemäß sehr differenziert auf beide Trockenextrakte, wobei der Propolistrockenextrakt in der Mehrzahl der Ergebnisse den Pappelknospenharztrockenextrakt in der antimykotischen Wirkung übertraf. Im getesteten Konzentrationsbereich beider Trockenextrakte von 0,175 bis zu 2,8 mg/ml Nährboden wurde eine vollständige Wachstumshemmung bei allen getesteten Erregern erzielt.

Am ausgeprägtesten war die antimykotische Wirkung beider Substanzen auf *Trichophyton mentagrophytes*, bei dem eine Konzentration von 0,175 mg/ml Propolistrockenextrakt bzw. 0,35 mg/ml Pappelknospenharztrockenextrakt für eine vollständige Hemmung des Erregerwachstums ausreichte. Die schwächste antimykotische Wirkung zeigten beide Trockenextrakte bei *Malassezia pachydermatis*.

Im folgenden sind die Wirkungen beider Substanzen für jeden getesteten Erreger angeführt.

**Malassezia pachydermatis**

Das Wachstum des Erregers trat durch den Zusatz der Substanzen zum Nährboden zeitlich verzögert auf. Die MHK beider Trockenextrakte betrug 2,8 mg/ml Nährboden.

**Candida albicans**

Die erste Auswertung des Wachstums erfolgte nach 2tägiger Inkubation, wobei festgestellt wurde, daß die MHK für Propolistrockenextrakt bei 0,35 mg/ml und für den Pappelknospenharztrockenextrakt bei 0,7 mg/ml lag. Bei den nach 5tägiger Inkubation durchgeführten Auswertungen wurde keine Abweichung des nach der ersten Untersuchung erhobenen Befundes festgestellt.

**Aspergillus fumigatus**

Die ermittelte MHK für Propolistrockenextrakt lag bei 0,7 mg/ml Nährboden, die für Pappelknospenharztrockenextrakt bei 1,4 mg/ml Nährboden. In jeweils der nächstniedriger gewählten Konzentrationsstufe traten bei beiden Substanzen Verzögerungen des Erregerwachstums auf, so daß diese bei der Auswertung nach 7tägiger Inkubation ein schwächeres Wachstum im Vergleich zur Kontrolle zeigten.

### **Trichophyton mentagrophytes**

Für Propolistrockenextrakt lag die ermittelte MHK bei 0,175 mg/ml Nährboden, für Pappelknospenharztrockenextrakt bei 0,35 mg/ml Nährboden. Durch beide Substanzen wurde eine Verzögerung des Erregerwachstum gegenüber der Kontrolle bewirkt. Sie trat erst nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen auf.

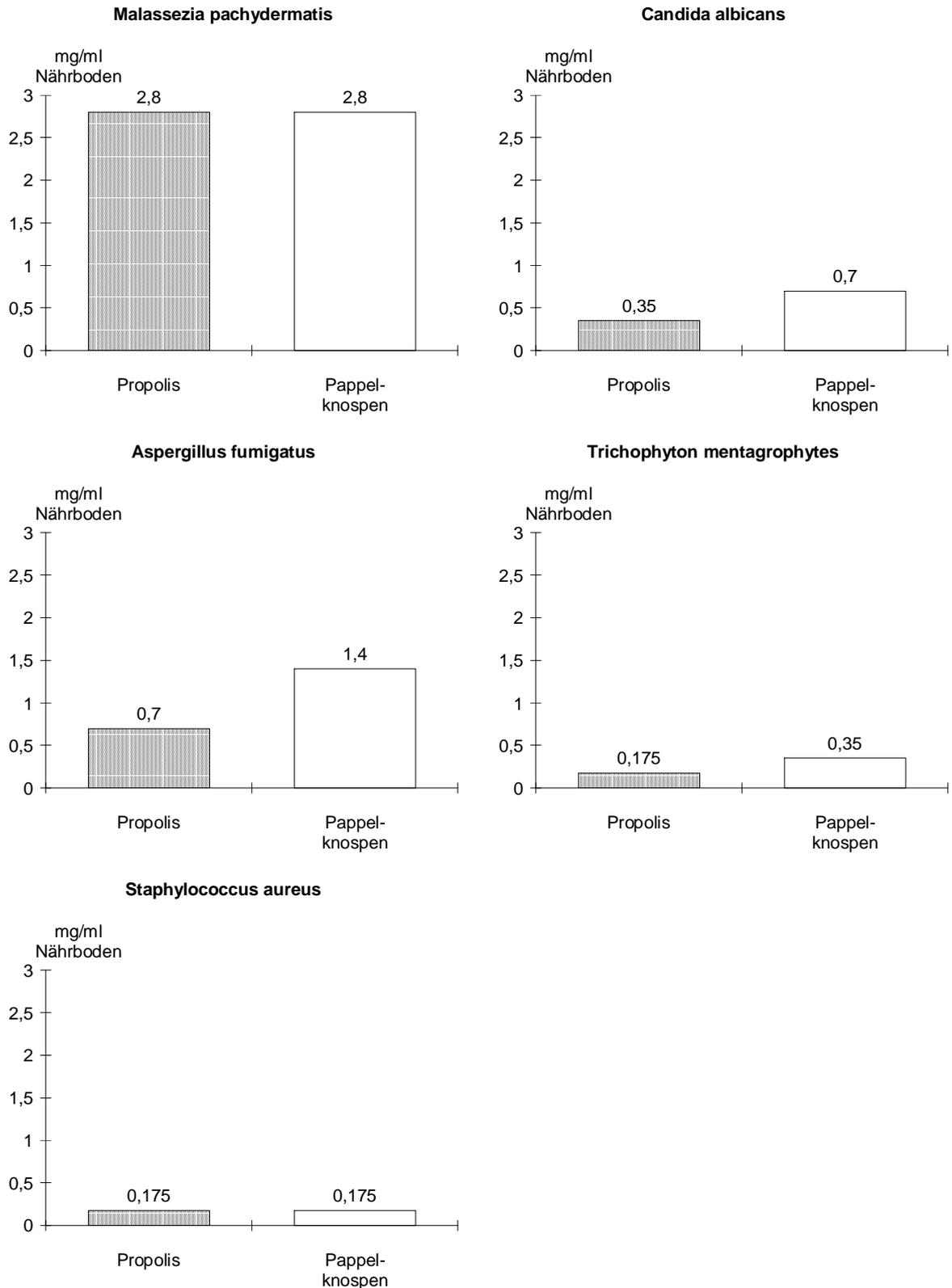
Die Ergebnisse der antibakteriellen und antimykotischen Wirkungen von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt auf die getesteten Bakterien, Hefen und Pilze sind in Tabelle 17 aufgelistet und in Abb. 2 anhand der MHK-Werte graphisch gegenübergestellt.

**Tabelle 17: Vergleich der Wirkung von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt auf das Wachstum von Bakterien, Hefen und Pilzen**

Spezies	Konzentration der getesteten Substanzen in mg je ml Nährboden					
		0,175	0,35	0,7	1,4	2,8
Staphylococcus aureus	Propolistrockenextrakt	-	-	-	-	-
	Pappelknospenharztrockenextrakt	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	Propolistrockenextrakt	++	++	+	+	+
	Pappelknospenharztrockenextrakt	++	++	+	+	+
Escherichia coli	Propolistrockenextrakt	++	++	++	++	++
	Pappelknospenharztrockenextrakt	++	++	++	++	++
Candida albicans	Propolistrockenextrakt	++	-	-	-	-
	Pappelknospenharztrockenextrakt	++	++	-	-	-
Aspergillus fumigatus	Propolistrockenextrakt	++	+	-	-	-
	Pappelknospenharztrockenextrakt	++	++	+	-	-
Trichophyton mentagrophytes	Propolistrockenextrakt	-	-	-	-	-
	Pappelknospenharztrockenextrakt	+	-	-	-	-
Malassezia pachydermatis	Propolistrockenextrakt	++	+	+	+	-
	Pappelknospenharztrockenextrakt	++	+	+	+	-

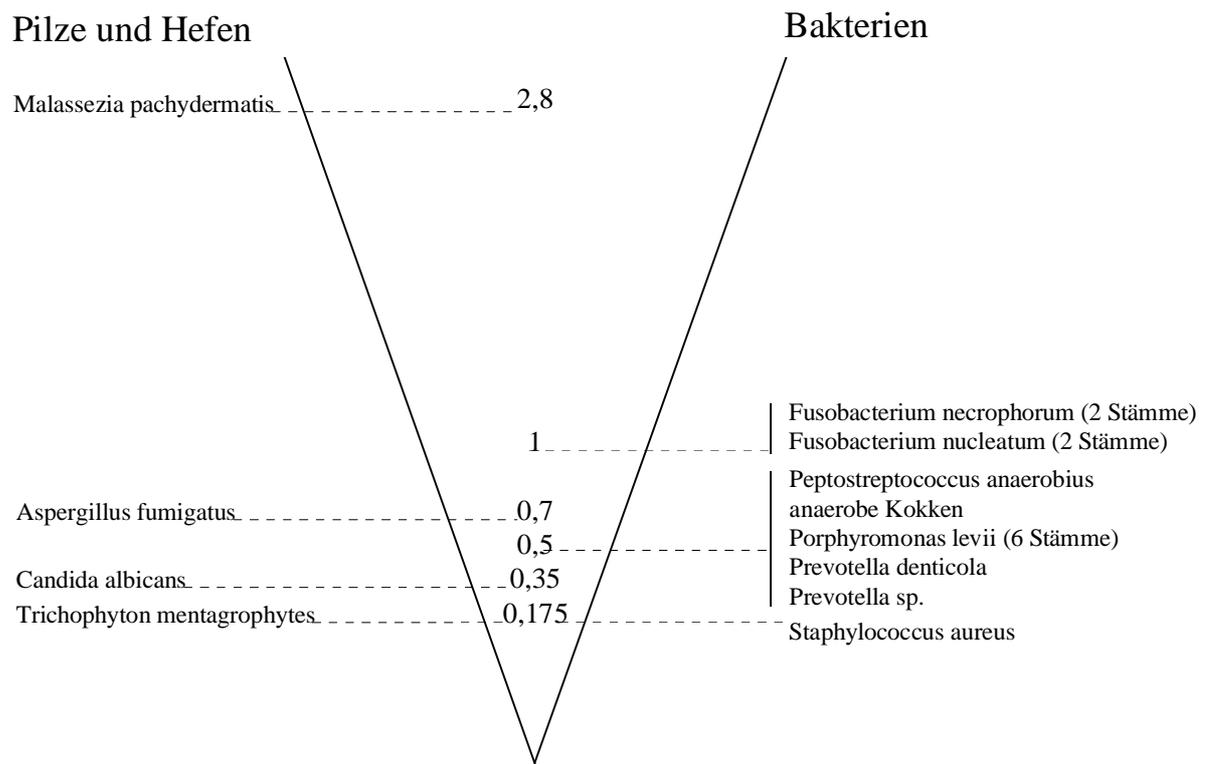
- kein Keimwachstum sichtbar
- + im Vergleich zu Kontrollen gehemmtes Wachstum
- ++ ungehemmtes Keimwachstum

**Abbildung 2: Vergleich der ermittelten MHK-Werte von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt (nachfolgend als Propolis und Pappelknospen gekennzeichnet)**



Die Auflistung aller erzielten MHK-Werte des Propolistrockenextraktes ist in Abbildung 3 dargestellt. Diese Werte wurden bei den Untersuchungen der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf anaerobe Bakterien sowie beim Wirkungsvergleich von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt auf Bakterien, Mycel- und Sproßpilze ermittelt.

**Abbildung 3: Minimale hemmende Konzentration des Propolistrockenextraktes für die getesteten Bakterien, Mycel- und Sproßpilze in mg/ml Nährboden**



### **3.3 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Viren**

#### **3.3.1 Material und Methoden**

##### **3.3.1.1 Propolistrockenextrakt**

Zur Überprüfung der antiviralen Wirkung von Propolis wurden die gleichen Zubereitungen, wie im Abschnitt 3.4.1.1 dargestellt, verwendet. Die Propolis lag in Form von Testlösungen, die ebenfalls zu der Überprüfung der Propoliswirkung auf Zellkulturen verwendet wurden, vor. Zur Ermittlung der antiviralen Aktivität wurden die Testlösungen

Nr. 2 mit 5 mg Propolistrockenextrakt/ml und

Nr. 3 mit 500 µg Propolistrockenextrakt/ml benutzt.

##### **3.3.1.2 Viren**

Zur Untersuchung der antiviralen Wirkung von Propolis wurden folgende veterinärmedizinisch relevante Viren ausgewählt:

1. Vesikulärstomatitis-Virus (VSV)

Familie: Rhabdoviren.

Die Stomatitis vesicularis wird durch das VSV hervorgerufen. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Blasen in der Mundhöhle sowie an den Klauen und Hufen.

Diese Infektion tritt vor allem bei Pferden, Rindern, seltener auch bei Schweinen auf.

2. Equines Herpesvirus 1 (EHV 1)

Familie: Herpesviridae

Das Virus ist bekannt als Erreger des Aborts der Stuten sowie der infektiösen

Entzündung der Nasenhöhle und der Lunge von Pferden.

##### **3.3.1.3 Zelllinie und Zellkultur**

Die Untersuchungen der antiviralen Aktivität von Propolis wurden auf der permanenten Zellkultur ED (equine Dermis) durchgeführt.

Das Wachstum der Zelllinie erfolgte im Nährmedium der gleichen Zusammensetzung wie unter 3.4.1.2 angeführt.

In den Plaquetests wurde zusätzlich das CMC Medium (Fa. Serva) verwendet.

#### **3.3.1.4 Geräte**

Zur Zellkultur der ED-Zelllinie wurden Geräte, wie unter 3.4.1.3 angeführt, verwendet.

#### **3.3.1.5 Vorversuche**

In den Vorversuchen wurde eine mögliche Beeinflussung der Viren durch das Lösungsmittel 70%iges Ethanol untersucht. Das Lösungsmittel wurde zum gleichen Zeitpunkt und in gleichen Volumina wie die Testlösungen dem Nährmedium der virusinfizierten Zellkulturen beigelegt.

Ein möglicherweise vorhandener synergistischer Effekt des Lösungsmittels auf die antivirale Aktivität der Propolis wurden in Vorversuchen überprüft. Hierbei wurden gleiche Endkonzentrationen Propolistrockenextrakt in Nährmedien der virusinfizierten Zellkulturen mit Testlösungen verschiedener Konzentration hergestellt.

Die den Nährmedien beigelegten verschiedenen Volumina des Lösungsmittels 70%iges Ethanol bewirkten, mikroskopisch untersucht, keine Hemmung der Viruswirkung in den jeweils infizierten Zellkulturen im Vergleich mit den Kontrollen. Ein Synergismus des Lösungsmittels mit Propolistrockenextrakt wurde bei den untersuchten virusinfizierten Zelllinien nicht festgestellt.

#### **3.3.1.6 Untersuchung der antiviralen Aktivität von Propolistrockenextrakt**

Die Zelllinien wurden in 24 well-Platten kultiviert. Die Inokulation der Zellkulturen mit EHV 1 oder VSV erfolgte 10 h nach der Einsaat von  $4 \times 10^4$  Zellen/well.

20 Minuten nach der Inokulation wurden die verschiedenen Volumina der propolistrockenextrakthaltigen Testlösungen dem Nährmedium mittels Mikropipette beigelegt. Die Konzentrationen von Propolistrockenextrakt lagen zwischen 1 und 140  $\mu\text{g}$  pro ml Nährmedium.

Alle Zellen wurden im begasbaren Brutschrank bei einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Luft von 5%, einer Luftfeuchte von 97% und der Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 78 h inkubiert.

Den Zellkulturen wurden bei der Inokulation verschieden hohe Virusmengen des EHV 1 (Volumina des Inokulums 1  $\mu\text{l}$  oder 10  $\mu\text{l}$ ) zugelegt, um eine Abhängigkeit der antiviralen Wirkung gleicher Konzentrationen Propolistrockenextrakt von der Höhe der Virusmenge festzustellen.

Die Vermehrung der Viren in den benutzten Zelllinien konnte anhand von mikroskopisch sichtbaren degenerativen Veränderungen, dem zytopathologischen Effekt (CPE) nachgewiesen werden. Der CPE läßt sich von dem zytotoxischen Effekt mikroskopisch gut unterscheiden.

Die Verhinderung des CPE durch Propolistrockenextraktzusatz wurde als antivirale Wirkung gewertet. Die optischen Auswertungen mit Hilfe der computergestützten Bildverarbeitung erfolgten nach einem Zeitraum von 24, 48 und 72 h der Inkubation der mit den Testlösungen versetzten infizierten Zellkulturen.

### **3.3.1.7 Plaquetests**

Der Plaquetest ist eine Untersuchungsmethode, die ein mengenmäßiges Erfassen von Viren ermöglicht und somit Aussagen über eventuelle antivirale Wirkungen von Stoffen zuläßt. Dieser Test wurde an mit VSV bzw. EHV 1 infizierten ED-Zelllinien durchgeführt.

Beim Plaquetest wurden die Einschichtkulturen mit Propolistrockenextraktzusatz im Nährmedium mit einem halbfesten Medium überschichtet. Dadurch war die Virusausbreitung eingeschränkt und konnte nur zwischen benachbarten Zellen erfolgen. Dabei blieb die Zerstörung des Zellrasens lokalisiert und ein Plaque entstand. Diese Plaques konnten nach dem Anfärben des Zellrasens ausgezählt und auf diese Weise eine Hemmung der Virusentwicklung bestimmt werden.

### **3.3.2 Ergebnisse**

#### **3.3.2.1 Antivirale Aktivität von Propolistrockenextrakt**

Die durchgeführten Versuche erbrachten eine Bestätigung der antiviralen Wirkung der Propolis. In Abhängigkeit von der Höhe der den Nährmedien zugesetzten Propolistrockenextraktkonzentrationen wurden durch die Viren hervorgerufene CPE in den Zellkulturen in verschiedenem Maße verhindert. Die erzielten Untersuchungsergebnisse sind nachfolgend für die verschiedenen Viren angeführt.

##### **EHV 1**

Die maximale Verhinderung der durch das EHV 1 induzierten CPE auf der ED-Zelllinie wurde bei den Konzentrationen von 125 µg des Propolistrockenextraktes/ml Nährmedium festgestellt. Die Propolistrockenextraktkonzentrationen über 125 µg/ml führten in zunehmenden Maße zu zytotoxischen Veränderungen in den Zellkulturen.

Bei Propolistrockenextraktkonzentrationen unter 125 µg/ml bis zu der letztgetesteten Konzentration von 1 µg/ml traten zunehmend CPE auf. In den Abbildungen 4 bis 7 ist die von der Propolistrockenextraktkonzentration abhängige Verhinderung der CPE eindeutig erkennbar.

Die mikroskopischen Untersuchungen nach 24 Stunden Inkubation der virusinfizierten Zellkulturen ED zeigten CPE, welche bei der nächsten Untersuchung nach 48 Stunden stärker ausgeprägt waren. Eine dritte, nach 72 h erfolgte Untersuchung erbrachte keine Veränderung des Befundes der zweiten Untersuchung.

Bei der Inokulation der ED-Zelllinie mit verschiedenen Virusmengen (Volumina des Inokulums 1 µl oder 10 µl) zeigten sich in allen getesteten Propolistrockenextraktkonzentrationen keine mikroskopisch sichtbaren Unterschiede der Propoliswirkung, unterschiedlich hohe Viruskonzentrationen wurden gleichermaßen gehemmt. Die infizierten Kontrollen zeigten von der Virusmenge abhängige Unterschiede. Hier erzeugten höhere Viruskonzentrationen stärkere CPE.

##### **VSV**

Der höchste Grad der Ausprägung der CPE auf der mit dem Virus der vesikulären Stomatitis infizierten Zelllinie ED wurde nach 48 Stunden Inkubation erreicht.

Eine starke Verminderung der virusinduzierten Zellveränderungen setzte ab einer Propolistrockenextraktkonzentration von 25 µg/ml ein und verblieb in unveränderter Form bis zu einer Konzentration von 125 µg/ml. Höhere Konzentrationen riefen vermehrt zytotoxische Wirkungen hervor. Bei Konzentrationen von unter 25 µg/ml bis zur geringsten Konzentration von 1 µg/ml zeigten sich zunehmend CPE.

Die Hemmung der CPE durch Propolistrockenextrakt auf der mit VSV infizierten ED-Zelllinie lag im Vergleich zur Infektion mit EHV 1 nicht in solch ausgeprägter Form vor.

Die Abbildungen 4, 5, 6, 7, 11 und 12 belegen die von der Konzentration des Propolistrockenextraktes im Nährmedium abhängige Minderung der durch das EHV 1 und die Abbildungen 4, 8, 9 und 10 der durch das VSV induzierten CPE.

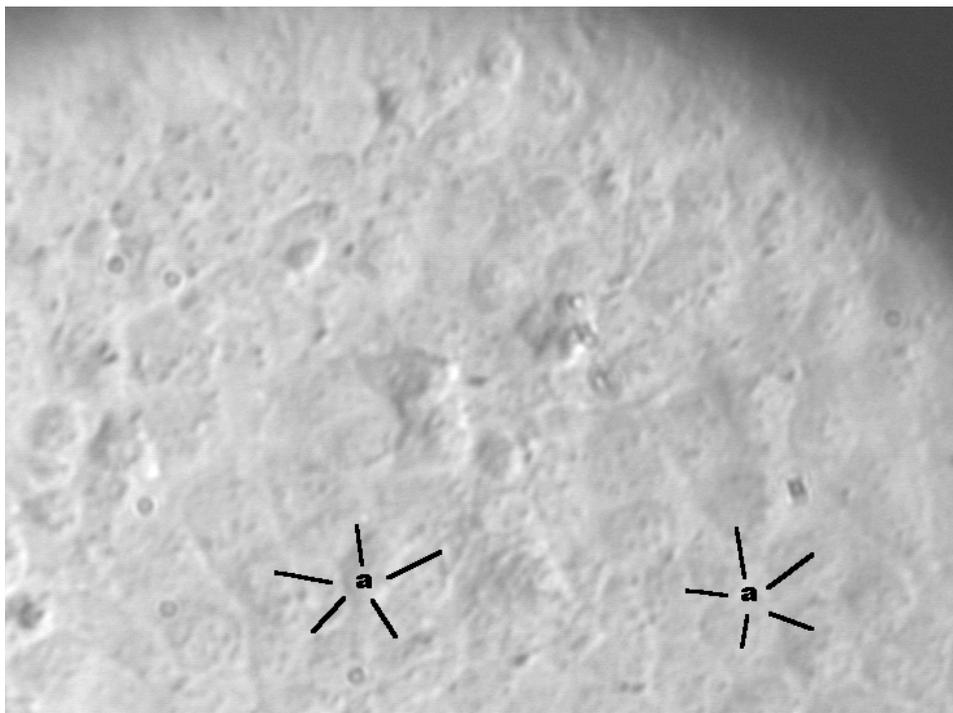
Erläuterung zu den Abbildungen 4-12:

a - morphologisch intaktes Zellwachstum in der Zellkultur (ED)

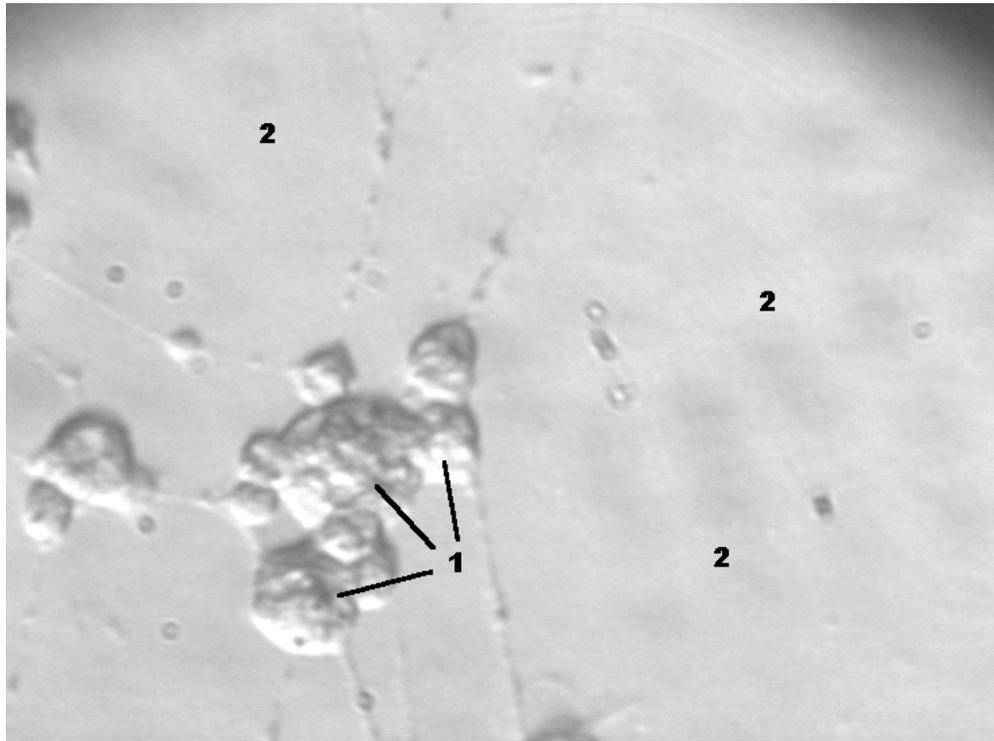
1 - durch CPE veränderte Zellen in der Zellkultur, deutlich sichtbar ist das blasige Auftreiben der durch Virenwirkung geschädigten Zellen sowie deren Verklumpen zu Zellagglomeraten

2 - zellfreie Gebiete in den durch CPE veränderten Zellkulturen

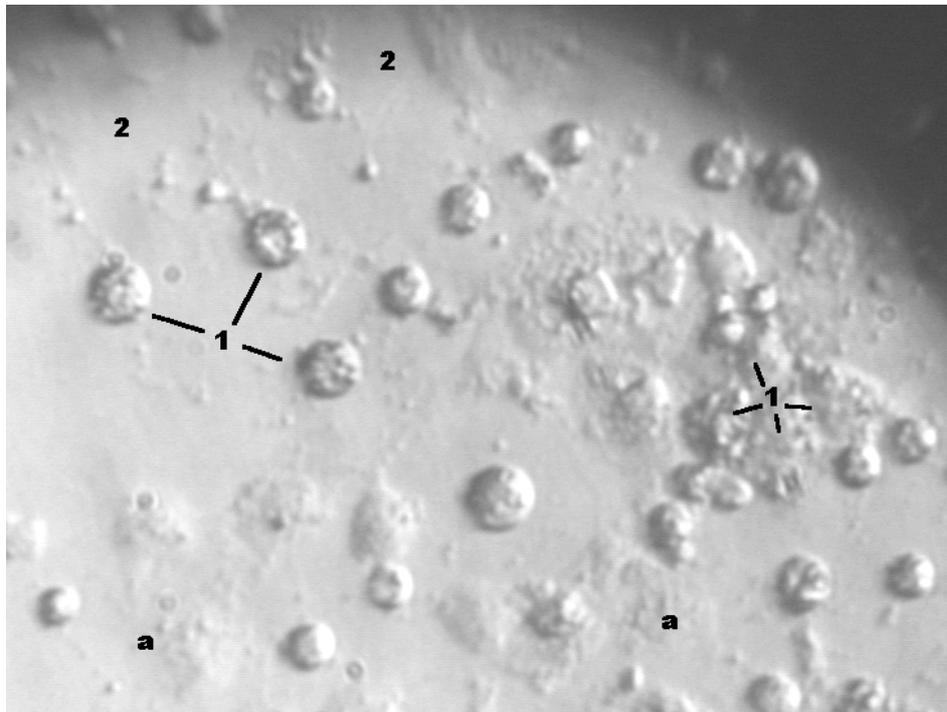
**Abbildung 4:** Normales Erscheinungsbild der equinen Dermis-Zelllinie (ED) nach 2 Tagen Inkubation (Vergrößerung 400fach)



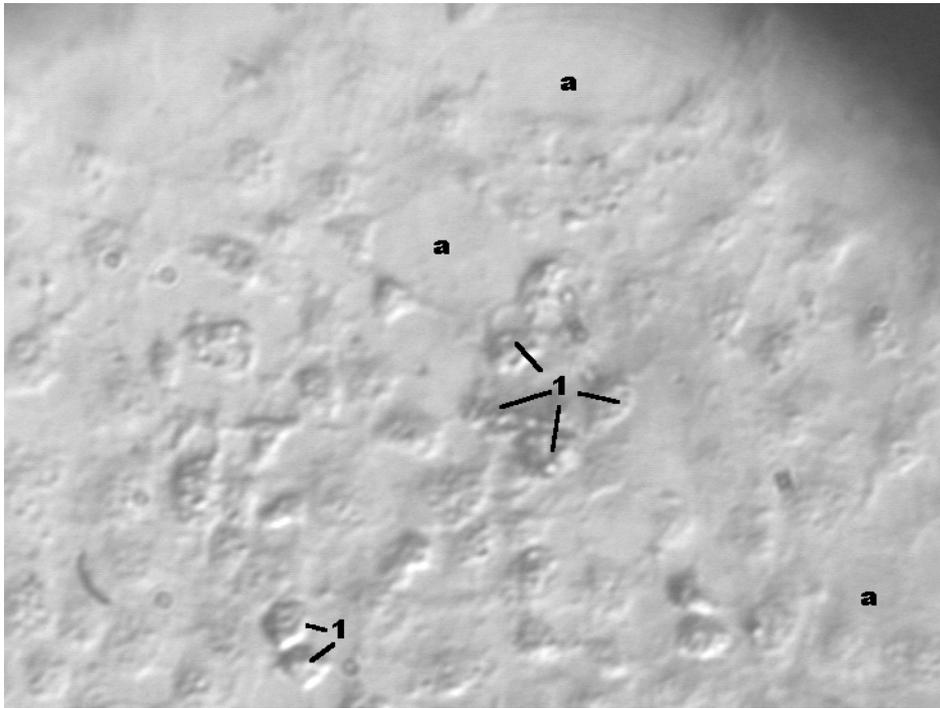
**Abbildung 5:** Bild stark ausgeprägter zytopathogener Effekte (CPE) in einer ED-Zellkultur 2 Tage nach Inokulation mit EHV 1 (Vergrößerung 400fach)



**Abbildung 6:** Verringerung der CPE in einer ED-Zellkultur durch die Propolistrockenextraktkonzentration von 62,5 µg/ml Nährmedium 2 Tage nach Inokulation mit EHV 1 (Vergrößerung 400fach)



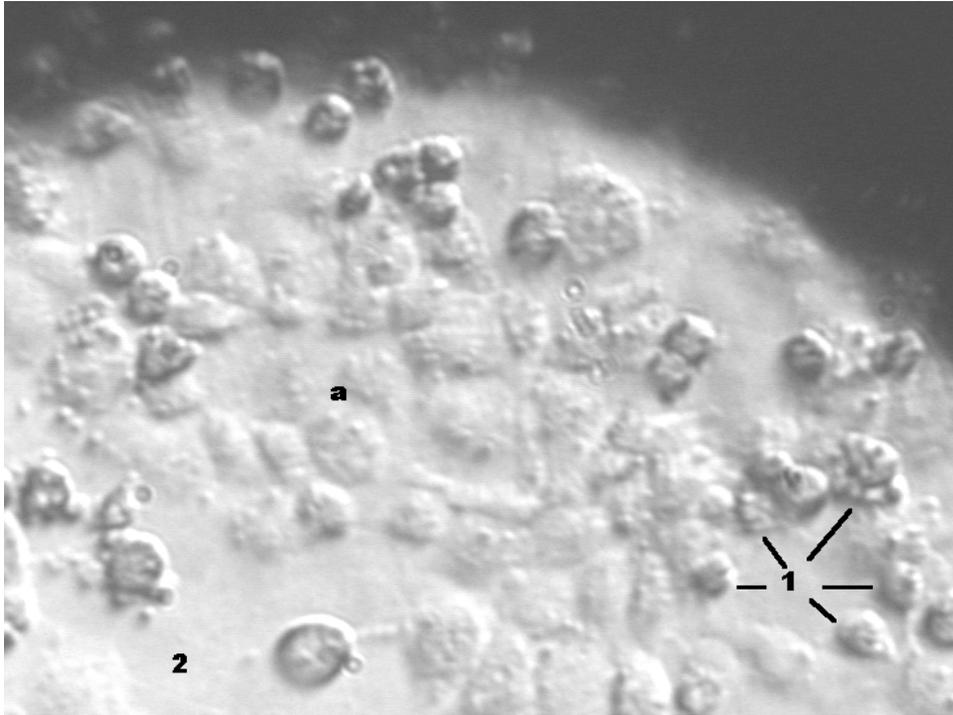
**Abbildung 7:** Starke Verringerung der durch das EHV 1 hervorgerufener CPE in einer ED-Zellkultur bei Propolistrockenextraktkonzentrationen von 125 µg/ml 2 Tage nach Inokulation (Vergrößerung 400fach)



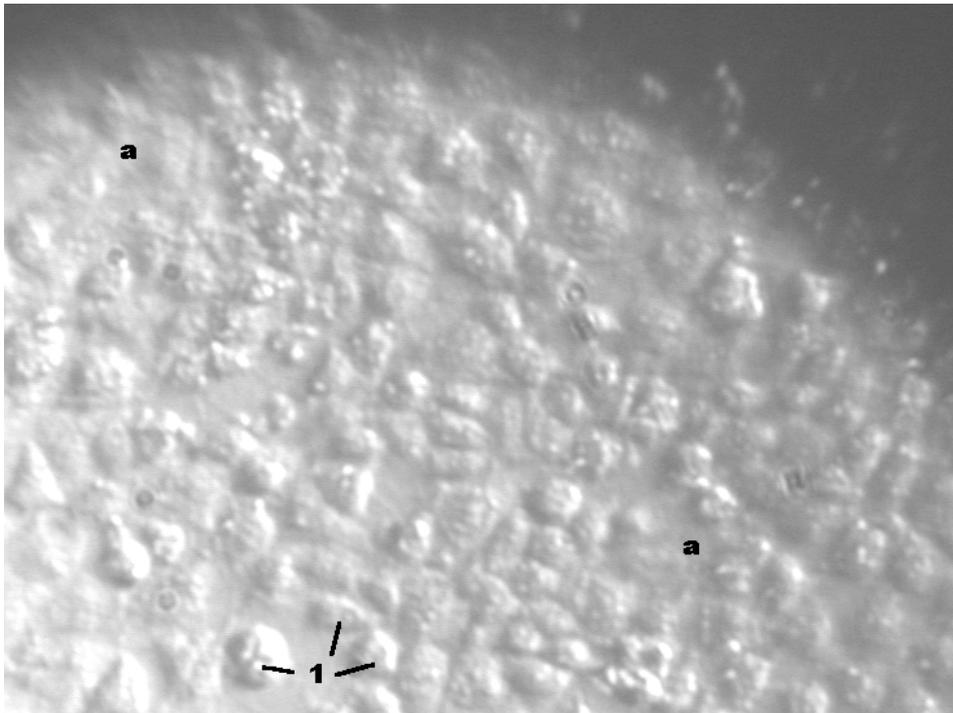
**Abbildung 8:** Bild der CPE in einer ED-Zellkultur 2 Tage nach Inokulation mit VSV (Vergrößerung 400fach)



**Abbildung 9:** Durch die Konzentration von 62,5 µg Propolistrockenextrakt je ml Nährmedium der ED-Zellkultur bewirkte teilweise Verhinderung der CPE durch das VSV 2 Tage nach Inokulation (Vergrößerung 400fach)



**Abbildung 10:** Erscheinungsbild einer ED-Zellkultur mit 125 µg Propolistrockenextrakt je ml Nährmedium 2 Tage nach Inokulation mit VSV (Vergrößerung 400fach)



### **3.3.2.2 Ergebnisse der Plaquetests**

Die mit den Plaquetest ermittelten Befunde bestätigen ebenfalls eine antivirale Aktivität des Propolistrockenextraktes auf die Viren EHV 1 und VSV.

#### **EHV 1**

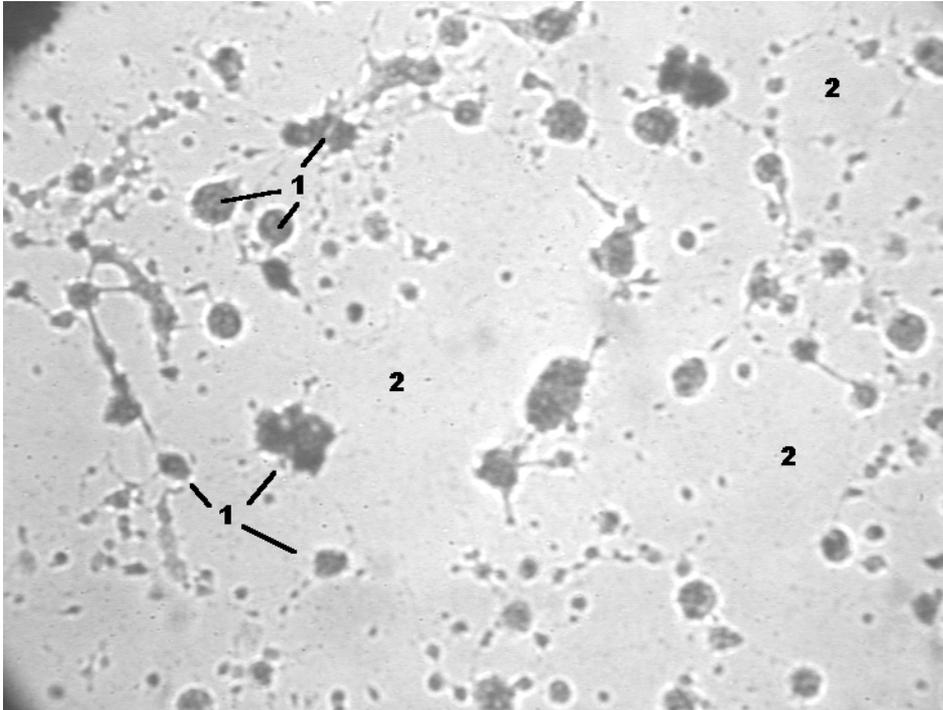
Nach einer 48stündigen Inkubationszeit der mit EHV 1 infizierten Zellkultur ED war der Zellrasen der infizierten Kontrolle vollständig aufgelöst (Abbildung 11), so daß Plaques nicht ausgezählt werden konnten. Bei einer Konzentration des Propolistrockenextraktes von 125 µg/ml Nährmedium wies der Zellrasen die wenigsten Plaques auf (Abbildung 12), höhere Propolistrockenextraktkonzentrationen riefen zytotoxische Effekte hervor, niedrigere führten zur Erhöhung der Plaqueanzahl im Zellrasen.

#### **VSV**

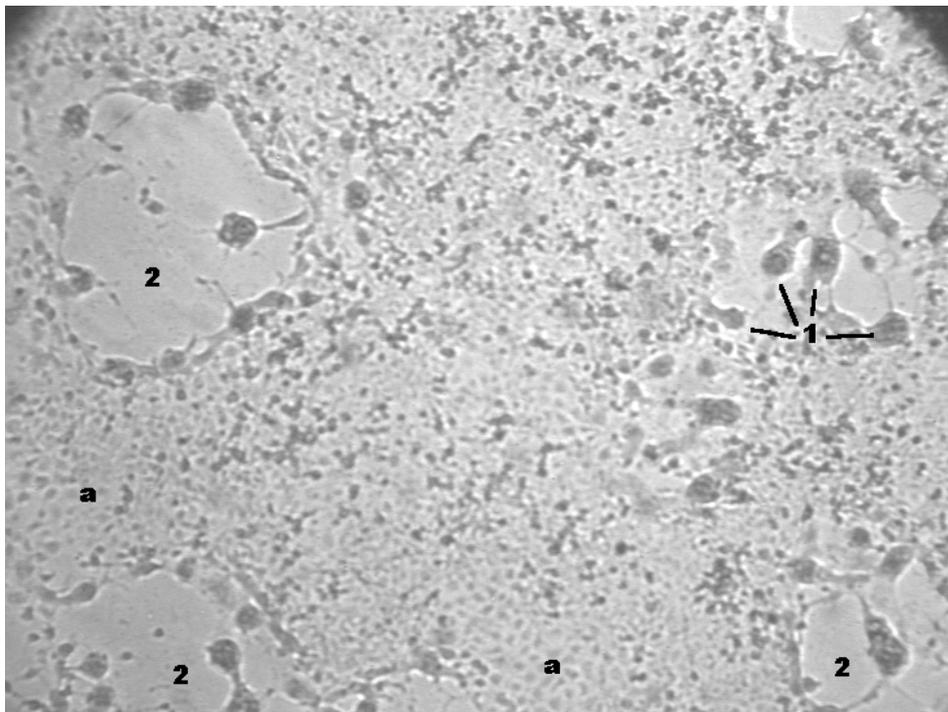
Nach 48 Stunden Inkubation der mit VSV infizierten Zellkultur ED wurde mikroskopisch die vollständige Auflösung des Zellrasens festgestellt. Eine Auszählung von Plaques war nicht möglich. Bei den virusinfizierten, mit Propolistrockenextrakt versetzten Zellkulturen wurde die geringste Anzahl Plaques bei einer Konzentration von 125 µg/ml festgestellt.

Niedrigere Konzentrationen von Propolistrockenextrakt im Nährmedium riefen eine Erhöhung der Plaqueanzahl hervor.

**Abbildung 11:** Vollständige Auflösung des Zellrasens einer ED-Zellkultur 2 Tage nach Inokulation mit EHV 1 im Plaquetest (Vergrößerung 50fach)



**Abbildung 12:** Plaquebildung 2 Tage nach Inokulation einer ED-Zellkultur mit EHV 1 bei der Propolistrockenextraktkonzentration von 125 µg/ml Nährmedium (Vergrößerung 50fach)



## **3.4 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Zellkulturen**

### **3.4.1 Material und Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf veterinärmedizinisch relevante Zelllinien**

#### **3.4.1.1 Propolistrockenextrakt sowie Herstellung der Testlösungen**

Für die Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Zelllinien waren verschiedene hohe Propolistrockenextraktkonzentrationen in den Nährmedien erforderlich. Aus diesem Grund wurden Propolistrockenextrakttestlösungen angefertigt.

Durch Lösen des gewonnenen Propolistrockenextraktes mit 70%igen Ethanol wurden Testlösungen folgender Konzentration hergestellt:

Lösung Nr. 1	mit 140 mg Propolistrockenextrakt/ml
Lösung Nr. 2	mit 5 mg Propolistrockenextrakt/ml
Lösung Nr. 3	mit 500 µg Propolistrockenextrakt/ml

Zur Lösungsbeschleunigung wurde das Ethanol im Wasserbad auf 50°C erwärmt.

#### **3.4.1.2 Zelllinien und Zellkultur**

Bei den Untersuchungen der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf lebende Zellen kamen folgende permanenten Zelllinien zum Einsatz:

ED	- equine Dermis-Zelllinie
bat	- Fledermauslungenzelllinie
FLK-BLV	- fetal lamb Kidney-BLV-infiziert VAN DER MAATEN et al.(1976)

Zur Testung der Wirkung von Propolis auf Zellen einer nichttransformierten Zelllinie wurde folgende Kultur verwendet:

HEF	- Zellkultur aus Hühnerembryofibroblasten.
-----	--

Das Wachstum der bat, FLK-BLV, ED und HEF Zelllinien erfolgte in einem Nährmedium folgender Zusammensetzung:

Leibovitz Medium	(Biochrom)	47%
Double Minimal Essential Medium (DMEM)	(Serva)	47%
Fötale Kälberserum	(Serva)	5%
Streptomycin/Penicillin-Lösung	(Jenapharm)	1%

### 3.4.1.3 Geräte

Zur Zellkultur der ED, bat, FLK-BLV und HEF Zelllinien wurde benötigt:

begasbare Brutschränke "Vitromat mytron"	(AdW)
24 well-Platten	(Nunc)
Mikropipetten und 10-100 µl Variopipetten	(Eppendorf)
Video Mikroskop "TELAVAL"	(Carl Zeiss Jena)
Bildverarbeitendes System "Image P 2"	
Videoprinter Mitsubishi	

### 3.4.1.4 Vorversuche

In Vorversuchen wurde eine mögliche Beeinflussung des Wachstums der Zellkulturen durch das verwendete Lösungsmittel, 70%iges Ethanol, untersucht. Dies geschah in Testreihen, in denen das Lösungsmittel in Volumen von bis zu 50 µl je ml Nährboden zugesetzt wurde.

Um einen möglichen Synergismus zwischen dem Lösungsmittels und dem Propolistrockenextrakt erfassen zu können, wurden in Vorversuchen gleiche Konzentrationen des Propolistrockenextraktes im Nährmedium der Zelllinien mit unterschiedlich konzentrierten Testlösungen hergestellt (z.B. 1 µl Testlösung Nr. 1 und 28 µl Testlösung Nr. 2).

Im einzelnen konnten bei den Vorversuchen an den Zellkulturen folgende Feststellungen gemacht werden:

Bei der nichttransformierten Zellkultur HEF wurde bis zu einer Konzentration von 50 µl Ethanol/ml Nährmedium kein Einfluß auf das Wachstum der Zellkultur festgestellt.

Die permanenten Zellkulturen ED und FLK/BLV wiesen in Konzentrationen bis 50 µl Ethanol/ml Nährmedium mikroskopisch keine strukturellen Zellveränderungen auf.

Bei Untersuchungen der bat-Zellkultur zeigten sich in Konzentrationen von 50 µl Ethanol/ml Nährmedium deutliche Zellschäden, in einer Konzentration von 25 µl/ml Nährmedium wurden mikroskopisch keine Zellveränderungen beobachtet.

Synergistische Effekte von Ethanol mit Propolistrockenextrakt auf Zellkulturen wurden in den Vorversuchen nicht festgestellt.

### 3.4.1.5 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Zelllinien

Die für die Untersuchung ausgewählten Zelllinien wurden in der Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/well in die 24 well-Platten ausgesät. Es folgte eine 10stündige Adhäsionsphase.

Danach wurden die verschiedenen Propolistrockenextraktkonzentrationen durch Zugabe unterschiedlicher Volumina der Testlösungen mittels Mikropipette in das Nährmedium eingestellt. Die getesteten Konzentrationen des Propolistrockenextraktes pro ml Nährmedium lagen zwischen 1 und 420  $\mu\text{g}$ . Die Konzentrationen über 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wurden durch das Hinzugeben der Testlösung Nr. 1, niedrigere Konzentrationen durch Zugabe der Testlösungen Nr. 2 oder 3 erreicht.

Je Lumen der 24 well-Platten (Durchmesser 1,6 cm) befanden sich 1,3 ml Nährmedium.

Im einzelnen wurde die Wirkung folgender Konzentrationen des Propolistrockenextraktes im Nährmedium auf die verschiedenen Zellkulturen untersucht:

untersuchte Zelllinien	Konzentration des Propolistrockenextraktes im Nährmedium in $\mu\text{g}/\text{ml}$										
	1	2,5	5	12,5	25	50	125	140	250	280	420
HEF			X		X	X	X		X		
bat	X	X	X	X	X	X		X		X	X
ED	X	X	X	X	X	X		X		X	X
FLK/BLV	X	X	X	X	X	X		X		X	X

Anschließend erfolgte die Inkubation der mit den Testlösungen versetzten Zellkulturen im begasbaren Brutschrank bei einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Luft von 5%, einer Luftfeuchte von 97% und Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Inkubationszeiten der Zellkulturen betragen bis zu 72 Stunden.

Die mikroskopischen Auswertungen der Propolistrockenextraktwirkung auf Zellkulturen erfolgten unter Zuhilfenahme der computergestützten Bildverarbeitung. Hierbei wurden mikroskopische Hinweise auf zytotoxische Effekte erfaßt, welche sich in einer Veränderung der Zellmorphologie zeigten. Anzeichen für eine Beeinflussung der Zellkulturen durch Propolisinhaltsstoffe waren das Zusammenschrumpfen von Zellen zu kleinen rundlichen Gebilden und das Hinterlassen von Lücken im Zellrasen durch Ablösung, später durch Auflösung absterbender Zellen.

### 3.4.2 Material und Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Proliferation in Zelllinien

#### 3.4.2.1 Propolistrockenextrakt

Für die Untersuchungen der Propoliswirkung auf die Proliferation in Zelllinien wurden die Testlösungen Nr. 2 mit 5 mg Propolistrockenextrakt und Nr. 3 mit 500 µg Propolistrockenextrakt/ml Lösung verwendet.

#### 3.4.2.2 Zelllinie und Zellkultur

Die Proliferationsmessung nach der Kristallviolettmethod wurde an folgender permanenten Zelllinie durchgeführt:

HaCaT - humane Keratinozyten-Zelllinie.<sup>1</sup>

Der serologische cELISA auf die Virusproteine gp 51 und p 24 erfolgte an der permanent bovines Leukosevirus produzierenden Zelllinie:

FLK-BLV - fetal lamb Kidney-BLV-infiziert VAN DER MAATEN et al. (1976).

Das BLV-Bovines Leukosevirus gehört zur Familie der Retroviren. Die enzootische Rinderleukose ist die durch dieses Virus hervorgerufene Erkrankung des lymphatischen Systems.

Das Wachstum der HaCaT-Kultur erfolgte in einem Nährmedium, bestehend aus:

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	(Gibco)	90%
Hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum (FCS)	(Gibco)	10%
Glutamin	(Gibco)	0,35 g/l
Streptomycin	(Boehringer)	0,1 g/l
Penicillin	(Boehringer)	100000 IU/l

Die Zusammensetzung des Nährmediums für das Wachstum der FLK-BLV-Zellkultur ist unter dem Punkt 3.4.1.2 angeführt.

---

<sup>1</sup>Die HaCaT-Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. N. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

### 3.4.2.3 Geräte und Reagenzien

Für die Proliferationsmessung nach der Kristallviolettmethode wurden benötigt:

96 und 24 well-Mikrotiterplatten	(Nunc)
Analysewaage 1602 MP	(Sartorius)
Magnetrührer	(Ika-Labortechnik)
10-100 µl Variopipetten	(Eppendorf)
Dynatech Microplate Reader MR 600	
1%ige Glutaraldehydlösung in PBS	
0,1%ige Kristallviolettlösung in PBS (täglich frisch angesetzt und filtriert)	
0,2%ige Triton-X-100 Lösung in PBS	

Für den serologischen cELISA wurden genutzt:

96 well-Mikrotiterplatten	(Nunc)
10 100 µl Variopipetten, 8-Kanal-Multipipetten	(Eppendorf)
ELISA-Reader	(SLT Labinstruments)
monoklonale Antikörper auf gp 51 und p 24	
Coatingpuffer	
Tween 20	(Merck)
10% Pferdeserum in PBS/Tween , pH 7,2	
4 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(Merck)

### 3.4.2.4 Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Proliferation der HaCaT-Zelllinie mit der Proliferationsmessung nach der Kristallviolettmethode

Der Aussaat der HaCaT-Zellen in 24 well-Platten mit gleicher Zelldichte je well schloß sich eine 10stündige Adhäsionsphase an.

Der dem Nährmedium in verschiedenen Mengen zugefügte Propolistrockenextrakt lag in Form der Testlösung Nr. 2 vor. Die Inkubation erfolgte nach Zugabe von je 500 µl der entsprechenden propolistrockenextrakthaltigen Prüfmedien über einen Zeitraum von 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft von 5% und einer Luftfeuchte von 97%. Die Konzentrationen des Propolistrockenextraktes je ml Nährmedium betragen: 1, 5, 10, 25 und 50 µg.

Die Proliferationsmessung der Zellen erfolgte mit der Kristallviolettmethode, modifiziert nach GILLIES et al. (1986).

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit je 500 µl PBS gespült. Durch die Zugabe von 250 µl 1%iger Glutaraldehydlösung in PBS wurden sie fixiert (30 Minuten) und anschließend erneut mit PBS gespült. Die Färbung der Zellen erfolgte für 30 Minuten mit jeweils 250 µl 0,1%iger Kristallviolettlösung, die Entfärbung in einem großen Gefäß mit entionisiertem Wasser innerhalb von 15 Minuten. Der an DNA gebundene Farbstoff wurde mit 500 µl 0,2%ige Triton-X-100 Lösung in PBS solubilisiert. Jeweils 100 µl des Überstandes wurden in die 96 well-Mikrotiterplatten überführt und die Extinktion im Microplate Reader bei 620 nm gemessen. Da eine proportionale Abhängigkeit gegeben ist, konnte so direkt eine Wachstumsinhibition bzw. -stimulation in Prozent zur Kontrolle berechnet werden.

#### **3.4.2.5 Serologischer cELISA auf die Virusproteine gp 51 und p 24**

Das Virus der bovinen Leukose wird in der FLK-BLV-Zellkulturen kontinuierlich produziert. Veränderungen des Zellwachstums durch Zusatz verschiedener Konzentrationen von Propolistrockenextrakt im Nährmedium dieser Zellkulturen führen so zu Veränderungen der produzierten Virusmenge. Die Virusmenge läßt sich serologisch durch Untersuchungen des Zellkulturüberstandes mit cELISA auf Virusproteine nachweisen. Die bedeutendsten Proteine des BLV sind das Glykoprotein gp 51 und das nichtglykosylierte Protein p 24.

Die Konzentrationen des Propolistrockenextraktes je ml Nährmedium der untersuchten FLK-BLV-Zellkulturen betragen 1 µg, 2 µg, 2,5 µg, 5 µg, 6,25 µg, 10 µg, 12,5 µg und 25 µg. Die Untersuchung der Zellkulturüberstände erfolgte nach 48 Stunden Inkubation.

Mikrotiterplatten wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen gp 51 oder p 24 in Coatingpuffer (pH 9,6) nach PLATZER et al. (1990) beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (PBS, 0,5% Tween 20) wurde der zu untersuchenden Zellkulturüberstand der FLK-BLV-Zellkulturen in PBST mit 10% Pferdeserum verdünnt (1:4), aufgetragen und 1 h bei 37°C inkubiert. Dem erneuten dreimaligen Waschen mit PBST folgte die Zugabe der jeweiligen monoklonalen Antikörper mit anschließender einstündiger Inkubation bei 37°C. Nach dem Waschen mit PBST folgte die Substratzugabe (0,1 M Phosphat, 0,5 M Citrat, pH 5,0, mit 10 mg OPD und 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 10 ml Puffer). Gestoppt wurde die Reaktion nach etwa 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur mit jeweils 50 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Extinktionsmessung erfolgte mit dem ELISA-Reader bei 492 nm.

### **3.4.3 Ergebnisse**

#### **3.4.3.1 Wirkung des Propolistrockenextraktes auf Zellkulturen**

Die Untersuchung der Propolistrockenextraktwirkung auf die nichttransformierte Zellkultur **HEF** erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden nach Zugabe der Testlösungen. Es zeigten sich keine qualitativen und quantitativen Unterschiede der Zellveränderungen bezüglich der zeitlich verschiedenen Untersuchungen. Dagegen waren deutliche graduelle Unterschiede der zytotoxischen Effekte durch verschieden hohe Propolistrockenextraktkonzentrationen im Nährmedium auszumachen.

Ein deutlicher zytotoxischer Effekt war bei der Konzentration von 250 µg/ml zu verzeichnen, wobei die abgestorbenen Zellen zu sphärischen Gebilden relativ einheitlicher Größe verklumpten. Lebende Zellen waren nicht nachzuweisen. Der im Nährmedium vorhandene Indikator zeigte keinen Farbumschlag, ein Indiz für das Fehlen von Metaboliten des zellulären Stoffwechsels. Die Konzentration von 125 µg/ml führte zu zytotoxischen Effekten, jedoch waren noch vereinzelte lebende Zellen in der typischen Spindelform nachweisbar.

Der Indikator im Nährmedium zeigte einen Farbumschlag, der jedoch nicht die gleiche Intensität wie bei der Kontrolle aufwies.

Bei einer Konzentration von 50 µg/ml Propolistrockenextrakt waren keine abgestorbenen Zellen zu erkennen. Eine geringe Anzahl von Zellen zeigte Auftreibungen, der Farbumschlag des Indikators erfolgte in gleicher Intensität wie bei der Kontrolle.

Bei Konzentrationen von 25 und 5 µg/ml Propolistrockenextrakt waren keinerlei Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle feststellbar.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der permanenten Zelllinien fanden nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation statt. Hierbei zeigten sich qualitäts- und quantitätsmäßige Veränderungen des Zellwachstums zwischen der ersten, zweiten und dritten Untersuchung im Bereich der niedrigen Propoliskonzentrationen.

Die im Verlauf der Untersuchungen der Propolistrockenextraktwirkung auf permanente Zelllinien ermittelten Ergebnisse werden nachfolgend dargelegt.

#### **ED-Zelllinie**

Bei der Untersuchung der permanenten Zellkultur ED nach 24 Stunden Inkubation führten Konzentrationen von Propolistrockenextrakt über 280 µg/ml Nährmedium zu ausgeprägten

zytotoxischen Effekten. Lebende Zellen konnten nach dieser Zeit mikroskopisch nicht mehr nachgewiesen werden. Der Indikator im Nährmedium zeigte keine Anwesenheit von metabolen Ausscheidungen der Zellen an.

Lichtmikroskopisch waren bei der Zelllinie ED in Konzentrationen über 140 µg/ml im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien große Mengen Zelldetritus sichtbar. Bei dieser Konzentration existierten noch wenige lebende Zellen, die Verfärbung des Indikators zeigte schwach das Vorhandensein von metabolen Endprodukten an.

Konzentrationen unter 50 µg/ml bewirkten in abnehmenden Maße Zellveränderungen, die Farbintensität des Indikators stimmte ab diesen Konzentrationen mit den Kontrollen überein.

Bei einer 48stündigen Inkubation wiesen die Zellen bis zu einer Konzentration von 5 µg/ml keine zytotoxischen Effekte auf. Hingegen nach 72 h Inkubation der Zellkulturen nur noch die Konzentrationen von 2,5 µg/ml und darunter mikroskopisch keine Unterschiede zur Kontrolle aufwiesen.

### **bat-Zelllinie**

Bei der nach 48 Stunden Inkubation durchgeführten Untersuchung bewirkte die Konzentration von 1 µg/ml noch keine Zellveränderungen. Die Untersuchung dieser Zelllinie nach 72 h Inkubation zeigte in allen Propolistrockenextraktkonzentrationen mikroskopische Veränderungen der Zellen.

Ab einer Konzentration über 140 µg/ml waren keine lebenden Zellen nachweisbar. Die abgestorbenen Zellen bildeten unregelmäßige Klumpen. Der Indikator im Nährmedium zeigte keinen Farbumschlag.

Die Propolistrockenextraktkonzentrationen von 50 µg/ml bis zu 1 µg/ml bewirkten in abnehmendem Maße Zellveränderungen wie das Auftreiben von Zellen und das Entstehen von Zusammenhangstrennungen im Zellrasen. Der Farbumschlag des Indikators wies auf noch bestehenden Stoffwechsel der Zellen hin.

Die zytotoxischen Effekte, gemessen an der Gesamtanzahl aller Zellen, traten bei dieser Zellkultur im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien in einem wesentlich höheren Maße auf.

### **FLK/BLV-Zelllinie**

Oberhalb der Konzentration von 280 µg/ml lagen nach 24 Stunden Inkubation ausgeprägte zytotoxische Effekte vor. Mikroskopisch wurden keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen, ein Farbumschlag des Indikators konnte nicht festgestellt werden.

Bei einer Propoliskonzentration von 140 µg/ml waren unter dem Mikroskop noch vereinzelt lebende Zellen erkennbar, ein schwacher Farbumschlag des Indikators zeigte das Vorhandensein metaboler Endprodukte an.

Die Konzentrationen unterhalb 50 µg/ml bewirkten kaum Zellveränderungen. Die Farbe des Indikators stimmte ab der Konzentration von 50 µg/ml abwärts mit der des Indikators der Kontrolle überein.

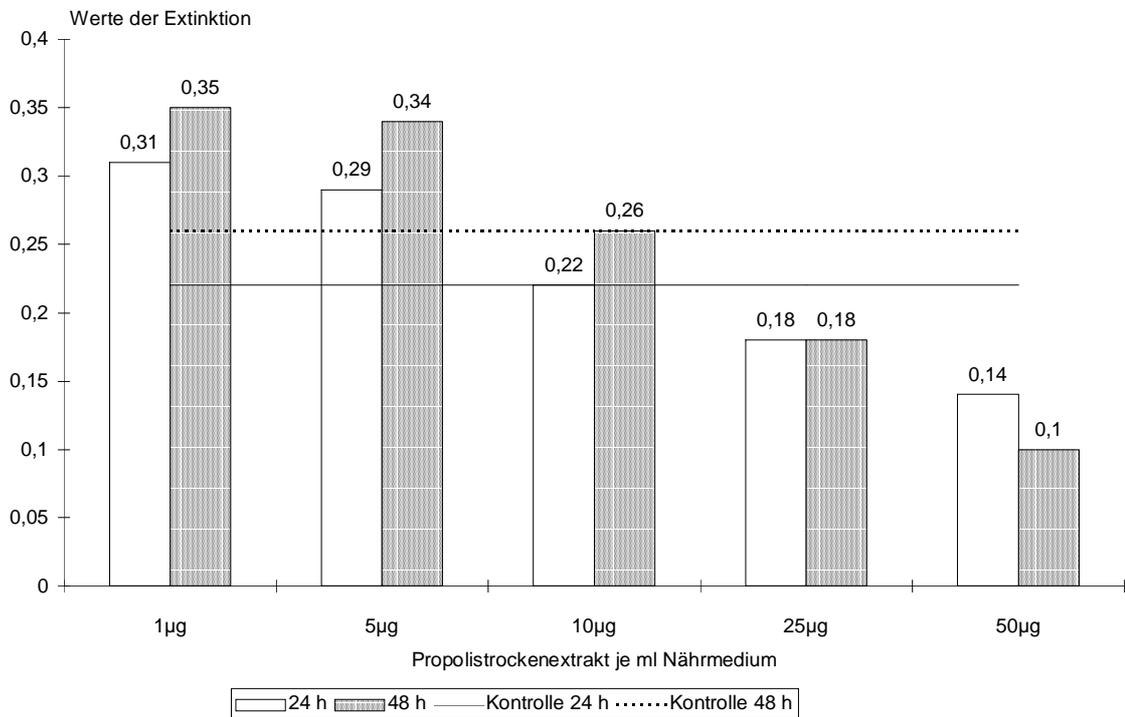
Bei den niedrigen Konzentrationen von 1 sowie 2,5 µg/ml wurde mikroskopisch nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Zellzahl festgestellt.

#### **3.4.3.2 Ergebnisse der Proliferationsmessung nach der Kristallviolettmethode an der HaCaT-Zelllinie**

Die Messungen der Extinktionen bei 1 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium zeigten eine Proliferationsstimulation bis zu 41% nach 24 Stunden und 35% nach 48 Stunden im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. In der getesteten Konzentration von 5 µg/ml Nährmedium zeigten die ermittelten Werte ebenfalls einen proliferationsfördernden Effekt, jedoch im geringeren Maße. Die Konzentration von 10 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium zeigte keine Beeinflussung der Proliferation im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, da sich die ermittelten Extinktionswerte der Versuche mit denen der Kontrolle deckten.

In den getesteten Konzentrationen über 25 µg/ml Nährmedium wirkte Propolistrockenextrakt antiproliferativ. Die ermittelten Werte der Extinktion der Versuche fallen unter die der Kontrollen. Die stärksten antiproliferativen Wirkungen von den getesteten Konzentrationen des Propolistrockenextraktes im Nährmedium wurden bei 50 µg/ml beobachtet. Die Proliferationshemmung zeigte sich in einer Verringerung der ermittelten Extinktionswerte auf 64% nach 24 h Inkubation und 39% nach 48 h Inkubation der jeweiligen Kontrollwerte.

Die Abbildung 13 verdeutlicht die Abhängigkeit der Proliferation der HaCaT-Zelllinie vom Gehalt des Propolistrockenextraktes im Nährmedium.

**Abbildung 13: Werte der Extinktionsmessungen der HaCaT-Zelllinie nach 24 und 48 h Inkubation**

Die Ergebnisse der nach 24 und 48 Stunden Inkubation der Zellkultur durchgeführten Extinktionsmessungen sind in der Tabelle 18 wiedergegeben.

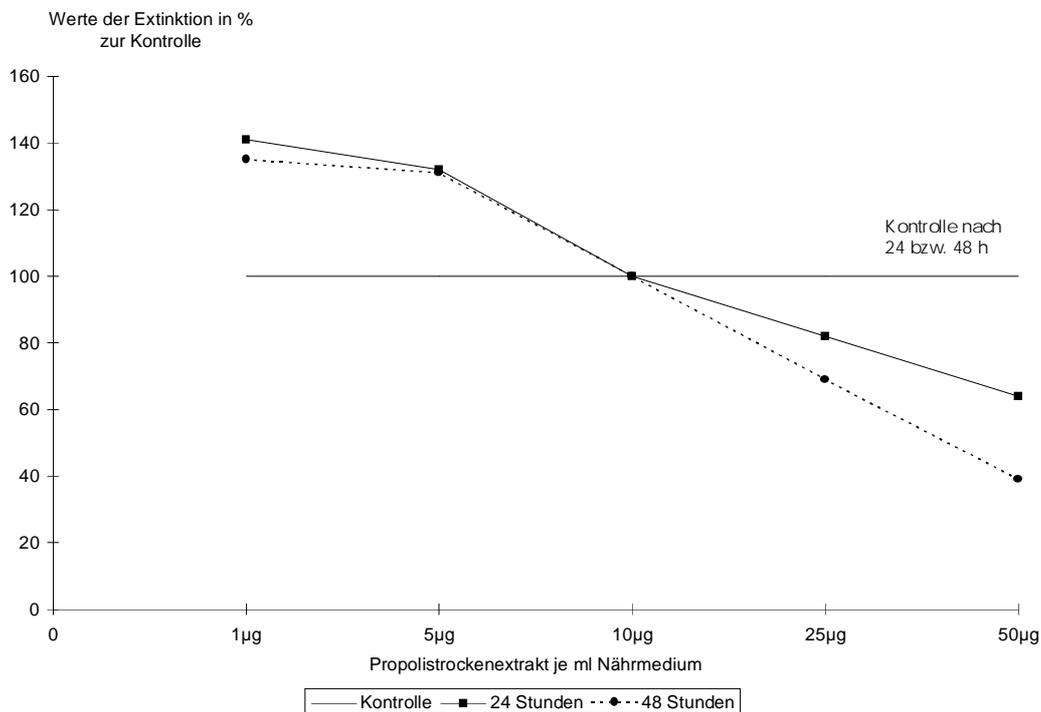
**Tabelle 18: Werte der Extinktionsmessungen der HaCaT-Zelllinie nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation in Prozent zur jeweiligen Kontrolle**

Propolistrockenextrakt je ml Nährmedium	Werte der Extinktion der HaCaT (Humane Keratinozyten-Zelllinie)			
	nach 24 Stunden Inkubation		nach 48 Stunden Inkubation	
Wert der Kontrolle	0,22	in % zur Kontrolle	0,26	in % zur Kontrolle
1 µg	0,31	141%	0,35	135%
5 µg	0,29	132%	0,34	131%
10 µg	0,22	100%	0,26	100%
25 µg	0,18	82%	0,18	69%
50 µg	0,14	64%	0,10	39%

Bei der Gegenüberstellung der Werte der Extinktionsmessung nach 24 bzw. 48 h Inkubation im Verhältnis zur Kontrolle (Abbildung 14) wird deutlich, daß die Proliferationserhöhung in Konzentrationen von 1 und 5 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium bereits nach 24 h Inkubation ihre höchste Ausprägung erreicht hat und nach 48 h Inkubation auf etwa diesem Niveau verblieb. Weiterhin zeigten die nach 48 Stunden Inkubation vorgenommenen Extinktionsmessungen eine Angleichung der proliferationsstimulierenden Wirkung durch unterschiedlich hohe Konzentrationen von Propolistrockenextrakt im Nährmedium. So unterschieden sich die Extinktionswerte bei 1 und 5 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium nur geringfügig.

Bei hohen Konzentrationen des Propolistrockenextraktes im Nährmedium konnte bei der zweiten Extinktionsmessung eine weitere Verstärkung der Wachstumshemmung festgestellt werden.

**Abbildung 14: Proliferation in der HaCaT-Zelllinie in Abhängigkeit vom Propolistrockenextraktgehalt im Nährmedium**



### 3.4.3.3 Ergebnisse des serologischen cELISA auf die Virusproteine gp 51 und p 24

Bei den serologischen cELISA auf Virusproteine des bovinen Leukosevirus, durchgeführt nach 48 Stunden Inkubation der Zellkultur FLK-BLV, wurde eine Veränderung der Mengen der Virusproteine gp 51 und p 24 im Zellkulturüberstand festgestellt. Diese Veränderung der Mengen beider Virusproteine war abhängig von der Propolistrockenextraktkonzentration im Nährmedium. Bei einer Konzentration von 1 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium wurde im Vergleich zu den Kontrollen eine Verringerung der Mengen der Virusproteine gp 51 und p 24 in den Zellkulturüberständen ermittelt. Innerhalb des Konzentrationsbereiches des Propolistrockenextraktes im Nährmedium zwischen 1 und 5 µg/ml war ein Anstieg der Mengen der Virusproteine zu verzeichnen. Die Konzentration von 5 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium bewirkte die maximale gemessene Erhöhung der gp 51 und p 24-Menge gegenüber den Kontrollen. Hierbei lagen die ermittelten Werte der Menge des Virusproteins p 24 über, die des gp 51 annähernd an den Proteinmengen in der Kontrolle.

Bei Konzentrationen des Propolistrockenextraktes über 5 µg bis zum letztgetesteten Konzentrationswert von 25 µg war eine stetige Verringerung der Menge beider Virusproteine im Zellkulturüberstand der FLK/BLV-Zellkultur nachweisbar.

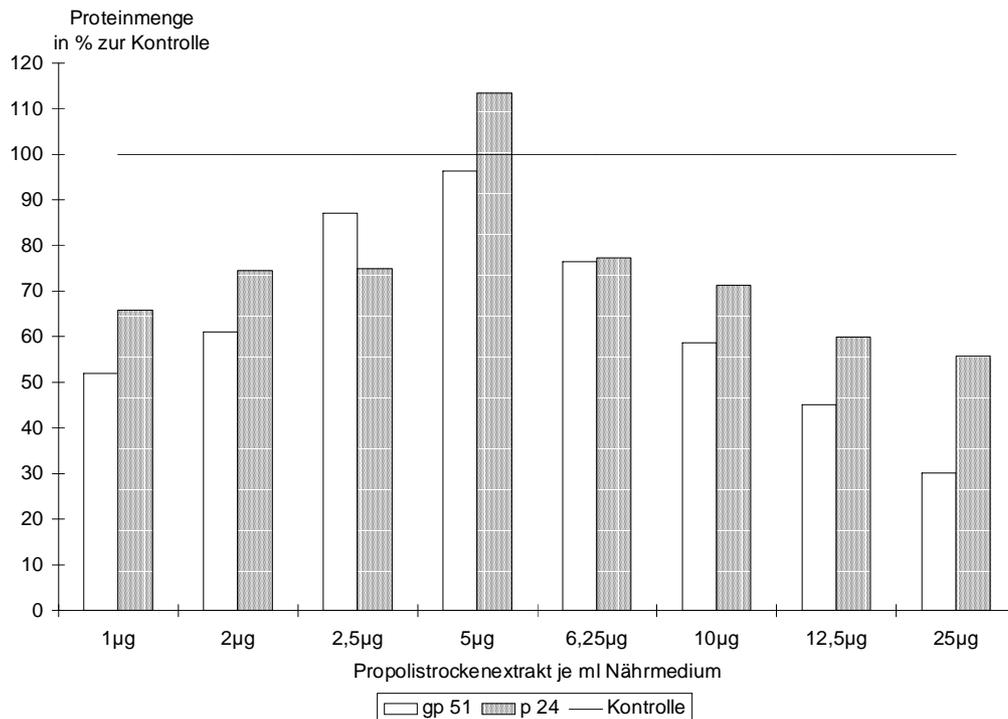
Einen Überblick über die Werte der produzierten Proteinmenge in Prozent zur Kontrolle für jeden einzelnen Konzentrationsschritt des Propolistrockenextraktes im Nährmedium der Zellkultur gibt die Tabelle 19.

**Tabelle 19: Produzierte Mengen der Proteine gp 51 und p 24 bei Zusatz verschiedener Mengen Propolistrockenextrakt zum Nährmedium in Prozent zur Kontrolle (nach 48 Stunden Inkubation)**

Propolistrockenextrakt je ml Nährmedium	1µg	2µg	2,5µg	5µg	6,25µg	10µg	12,5µg	25µg
Virusprotein gp 51	51,98%	60,99%	87,12%	96,31%	76,44%	58,63%	45,11%	30,12%
Virusprotein p 24	65,74%	74,49%	74,9%	113,4%	77,2%	71,21%	59,93%	55,7%

Die Abhängigkeit der in der FLK/BLV-Zellkultur produzierten Menge der Virusproteine des bovinen Leukosevirus vom Propolistrockenextraktgehalt im Nährmedium zeigt Abbildung 15.

**Abbildung 15:** Abhängigkeit der produzierten Mengen der Proteine gp 51 und p 24 vom Propolistrockenextraktgehalt im Nährmedium ( $\mu\text{g/ml}$ ) in Prozent zur Kontrolle (nach 48 Stunden Inkubation)



## 4 Diskussion

Propoliszubereitungen werden in der Humanmedizin verschiedener Länder erfolgreich in Dermatologie, Stomatologie, Gynäkologie, Otorhinolaryngologie u.a. angewendet. Publikationen einer Vielzahl von Autoren (vgl. PESCHANSKIJ 1970,73,74,76, DANILOW 1973, MAKASCHWILI 1974, DURMANENKO 1976, GROBOW 1976, LARION et al. 1983, SZÜCS 1983, GEORGIJEW A et al. 1983, KALMAN 1983, IWLEW 1985, OMAROW 1988, BOLTSCHAKOW 1989, MAYER 1990, OLESCHKO et al. 1991, FILIPOW 1991, LOTZE et al. 1991, LIWSCHITZ 1993, DONADIEU 1994, MINEDSCHJAN 1996) bestätigen die hohe Effizienz von propolishaltigen Medikamenten bei der Therapie bestimmter Erkrankungen. Diesen positiven Erfahrungen zufolge könnte die Propolis eine sinnvolle Ergänzung des Arzneischatzes auch in der Veterinärmedizin darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu verschiedenen Wirkungen von Propolis durchgeführt. Unter klinischen Bedingungen erfolgte die Überprüfung der Effizienz zweier eigens hergestellten Propoliszubereitungen bei der Otitis externa des Hundes. In mikrobiologischen Untersuchungen wurde der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf anaerobe Erreger nachgegangen. Weitere mikrobiologische Untersuchungen verglichen die antibakterielle sowie antimykotische Wirksamkeit von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt. An einigen veterinärmedizinisch relevanten Viren wurde die antivirale Aktivität von Propolistrockenextrakt geprüft. Die Wirkung von Propolistrockenextrakt auf permanente und nichtpermanente Zellkulturen wurde untersucht. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Zellproliferation verschiedener Zelllinien. Die erzielten Ergebnisse werden im folgenden diskutiert.

### 4.1 Zur Wirkung von Propoliszubereitungen bei der Otitis externa des Hundes

Die bei Hunden auftretende Otitis externa erfordert in der Kleintierpraxis oft eine lange und aufwendige Behandlung. Dabei stehen die mit Chemotherapeutika und Glukokortikoiden erzielten Ergebnisse nicht immer in einer vertretbaren Relation zum getätigten Aufwand.

Desweiteren treten nach der abgeschlossenen Behandlung vielfach Rezidive auf, die meistens zum chronischen Verlauf der Otitis externa führen. Auch neue, anfangs wirksame kommerzielle Otitis externa-Präparate zur lokalen Anwendung, deren Hauptbestandteile Antibiotika,

Antimykotika und Glukokortikoide sind, führten bis heute zu keiner entscheidenden Verbesserung in der Therapie, da sich oft nach kurzer Anwendungsdauer resistente Erregerstämme entwickelten. Aufgrund der steigenden Tendenz von Polyresistenzen der Erreger, die zum Hauptspektrum der Otitis externa gehören, wird in der Zukunft mit einer abnehmenden Effizienz der Behandlungsmöglichkeiten zu rechnen sein.

Die Überprüfung zweier eigens hergestellter Propoliszubereitungen bei der Behandlung der Otitis externa des Hundes unter Praxisbedingungen zeigte eine hohe therapeutische Effizienz. Von insgesamt 51 Hunden mit Otitis externa, die mit Propoliszubereitungen behandelt wurden, konnte bei 50 Patienten eine vollständige Heilung erzielt werden. Nur bei einem Hund war kein Therapieerfolg feststellbar.

Der bei den Behandlungen mit Propoliszubereitungen beobachtete kontinuierliche, überwiegend innerhalb einer Woche abgeschlossene Heilungsprozeß sowie die Rezidivfreiheit über einen Beobachtungszeitraum von 3 Monaten sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf folgende pharmakologische Eigenschaften der Propolis zurückzuführen:

1. die breite chemotherapeutische Wirkung auf grampositive und gramnegative Erreger sowie Pilze (vgl. KIWALKINA 1964b, KARIMOWA 1960, ALEKSANDROW et al. 1974, ČIŽMÁRIK et al. 1976a, METZNER et al. 1977, 1979, PEPELNJAK et al. 1982, VERZÁR et al. 1983, MERESTA et al. 1985),
2. die antiphlogistische Wirkung der Propolis (vgl. DOBROWOLSKI et al. 1991, KHAYYAL et al. 1993),
3. die reparative und granulationsfördernde Wirkung der Propolis (vgl. SCHELLER et al. 1977c, 1978, STOJKO et al. 1978, RODE et al. 1983, KAZAKOW et al. 1964, ARZUAGA 1988),
4. die unverminderte Wirkung auf Erreger auch beim Vorliegen von Polyresistenzen dieser Erreger gegen Chemotherapeutika, insbesondere Antibiotika (vgl. KIWALKINA 1964b, ČIŽMÁRIK et al. 1976a).

Im Verlauf der klinischen Untersuchungen wurde ein Vergleich der therapeutischen Effizienz von zwei Propoliszubereitungen mit verschiedenen Propolistrockenextraktgehalten und verschiedenen Trägermedien vorgenommen. Beide Propoliszubereitungen unterschieden sich nicht in ihrer Effizienz. Die Propolistrockenextraktkonzentration beider Propoliszubereitungen von 7% bzw. 10%, die bei der Otitis externa-Therapie des Hundes erfolgreich angewendet wurden, bestätigt die aus der Fachliteratur stammenden Konzentrationsangaben von Propolis in

Zubereitungen, die sich z.B. bei der Behandlung von erregerbedingten Hautkrankheiten in der Humanmedizin bewährt haben WOZNIAK et al. (1972) u.a..

Um einen möglichen Einfluß der Erregerpalette des jeweiligen Otitis externa-Falles auf die Wirksamkeit der Propoliszubereitungen abzuklären, wurden in einem Teil der Otitis externa-Fälle bakteriologische und mykologische Untersuchungen durchgeführt (1. Gruppe). Das dabei isolierte Erregerspektrum und die ermittelte Dominanz von grampositiven Erregern in den untersuchten Otitis externa-Fällen stimmte mit den Literaturangaben überein (vgl. WALLMANN 1990, KISS 1994, MÜLLER et al. 1994). Die geringe Nachweisquote von *Malassezia pachydermatis* im Untersuchungsmaterial der ersten Patientengruppe könnte durch das verwendete Transportmedium bedingt sein, denn es ist anhand der Literaturangaben anzunehmen, daß diese Hefe bei den behandelten Otitiden eine stärkere Rolle spielen dürfte (vgl. DUFAIT 1977, NICKLAS 1979, WALLMANN 1990, CIESLICKI 1991).

Das gehäufte Auftreten von *Clostridium perfringens* war nur für Patienten aus einer Hundevermischung charakteristisch und bestätigt damit Angaben von CIESLICKI (1991), der Unterschiede in der Zusammensetzung der Isolate von Probandenmaterial verschiedener Herkunft (Einzeltiere, Tiere aus Hobbyzuchten und Tiere aus kommerziellen Zuchten) verzeichnete. In der zweiten Behandlungsgruppe von Otitis externa-Patienten konnte keine bakteriologische und mykologische Untersuchung durchgeführt werden. Jedoch kann davon ausgegangen werden, daß die Erregerpalette der in der Fachliteratur allgemein bekannten entsprach. Somit kann festgestellt werden, daß der in beiden Zubereitungen enthaltene Propolistrockenextrakt eine breite antibakterielle und antimykotische Wirkung gegen das für Otitis externa typische Erregerspektrum aufwies.

Eine kombinierte Anwendung von Propolis mit Antibiotika, von einigen Autoren wie KIWALKINA (1964b), TURSUNALIEW (1985), IBRAGIMOWA et al. (1988), KROL et al. (1993) bei anderen erregerbedingten Erkrankungen erfolgreich praktiziert, läßt bei der Otitis externa-Therapie ebenfalls gute Behandlungsergebnisse erwarten. Aus pragmatischen Gründen ergibt sich die Notwendigkeit, neben den laufenden wissenschaftlichen Arbeiten auf der Suche nach qualitativ höheren konventionellen Präparaten verstärkt alternative therapeutische Mittel, einschließlich bereits vorhandener Naturheilmittel, zielgerichtet in der Praxis der Otitisbehandlung einzusetzen. Dabei sollten vor allem solche untersucht und verwendet werden, die folgende Eigenschaften besitzen: eine breite antibakterielle und antimykotische Wirkung, eine entzündungshemmende Wirkung und eine Eignung für die Langzeitbehandlung ohne Entstehung von resistenten Erregerstämmen. Diese Eigenschaften sind in der Propolis

optimal vereint, seit langem bekannt und wissenschaftlich belegt. Darüber hinaus besitzt sie nachgewiesene regenerationsfördernde (SCHELLER et al. 1977c, 1978, STOJKO et al. 1978, RODE et al. 1983), anästhesierende (DOROSCHENKO 1988, TZAKOFF 1975, PAINTZ et al. 1979) sowie immunmodulierende Wirkung (ALEKSANDROW et al. 1974, KIWALKINA 1988, MANNAPOWA et al. 1988).

Die Behandlung mit herkömmlichen Otitis externa-Präparaten stellt oft durch mehrmalige tägliche Applikationen über einen längeren Zeitraum eine erhebliche Belastung des Patienten sowie des Patientenbesitzers dar. Dies stellt in manchem Fall den Therapieerfolg in Frage. Ein weiterer Vorteil der Otitis externa-Therapie mit Propolispräparaten für Patient und Patientenbesitzer besteht darin, daß nur eine tägliche Applikation erforderlich ist.

Die desodorierende Eigenschaft der Propolis ist ein zusätzlicher positiver Aspekt bei der Therapie von mit üblen Gerüchen begleiteten Otitis externa-Fällen.

Über allergische Reaktionen auf Propolis gibt es in der veterinärmedizinischen Literatur keine Angaben. Auch im Verlauf der vorliegenden lokalen Behandlung der Otitis externa-Patienten mit propolishaltigen Zubereitungen wurden keine örtlichen allergischen Reaktionen oder andere Nebenwirkungen beobachtet. Es erscheint daher möglich in der Veterinärmedizin, Propoliszubereitungen auch über einen längeren Zeitraum anzuwenden.

Ausgehend von den bei der lokalen Otitis externa-Therapie mit Propoliszubereitungen erzielten guten Ergebnissen ist anzunehmen, daß die Anwendungsmöglichkeiten von Propolispräparaten in der Veterinärmedizin, einschließlich der in der Literatur angegebenen, breit gefächert sein könnten. In erster Linie betrifft das die Gruppe der Hautkrankheiten mikrobieller und/oder mykotischer Genese.

## **4.2 Wirkung von Propolis- und Pappelknochenharztrockenextrakt auf Bakterien, Pilze und Hefen**

Über die antibakterielle Wirkung der Propolis auf anaerobe Erreger existieren wenige Untersuchungsergebnisse. In bisherigen Untersuchungen aus der Humanmedizin von Autoren wie KEDZIA (1986) und FOCHT et al. (1993) wurde eine hohe Empfindlichkeit des anaeroben Erregerspektrums von Erkrankungen der Mundhöhle sowie der oberen Luftwege gegen Propolis festgestellt.

Die eigenen Untersuchungen belegten eine antibakterielle Wirksamkeit von Propolistrockenextrakt auf alle getesteten anaeroben Bakterien. Die Gesamtheit der 14

geprüften Stämme wurden durch Zusatz von 1,0 mg Propolistrockenextrakt/ml Nährboden vollständig im Wachstum gehemmt. Innerhalb des getesteten Spektrums der anaeroben Erreger bestanden gattungsabhängige Unterschiede in der Empfindlichkeit gegen Propolistrockenextrakt. Die Wirksamkeit des Propolistrockenextraktes auf Vertreter einer Art war gleich. Die erzielten MHK-Werte der überprüften 2 Stämme *Fusobacterium nucleatum* und 2 Stämme *Fusobacterium necrophorum* lagen bei einer Konzentration von 1 mg Propolistrockenextrakt je ml Nährboden. Bei Untersuchungen zur Wirksamkeit von Propolis auf Bakterien, darunter *Fusobacterium necrophorum*, stellte KIWALKINA (1964) eine Empfindlichkeit dieses Erregers gegen Propolis fest, die höher war als die von *Staphylococcus aureus*.

In den eigenen Untersuchungen erwies sich *Staphylococcus aureus* mit einem MHK-Wert von 0,175 mg Propolistrockenextrakt/ml Nährboden im Vergleich zu *Fusobacterium necrophorum* als empfindlicher. Für die Mehrheit der überprüften anaeroben Erreger: 6 Stämme *Porphyromonas levii*, je einem Stamm *Prevotella denticola*, *Peptostreptococcus anaerobius*, anaeroben Kokken und *Prevotella sp.* wurden MHK-Werte von 0,5 mg Propolistrockenextrakt/ml Nährboden ermittelt.

Die in den eigenen Untersuchungen ermittelten MBK-Werte für Propolistrockenextrakt im Nährboden bei einem Teil der getesteten anaeroben Erreger hatten, bedingt durch die verwendeten Konzentrationsschritte, die gleiche Höhe wie die ermittelten MHK-Werte. MERESTA et al. (1985) stellten in diesem Zusammenhang fest, daß der MBK-Wert bei allen von ihnen getesteten Erregern etwas über dem MHK-Wert der Propolis für die gleichen Erreger lag. Somit ist anzunehmen, daß die in den eigenen Untersuchungen ermittelten MHK-Werte für diese Erreger etwas niedriger sein dürften.

Es wurde festgestellt, daß alle getesteten, dem Spektrum der Dermatitis digitalis des Rindes zugehörigen Keime *in vitro* durch geringe Propolistrockenextraktkonzentrationen gehemmt wurden. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß mit propolishaltigen Medikamenten eine Behandlung der Dermatitis digitalis des Rindes durchgeführt werden könnte. Bei solch einer Therapie ist eine konstante Propolistrockenextraktkonzentration über eine kontinuierliche Einwirkung eines propolishaltigen Medikamentes im Gebiet der Hautläsionen erforderlich. Natürlich lassen sich die Ergebnisse von *In-vitro*-Untersuchungen nicht ohne weiteres auf die praktische Anwendung übertragen, sie können jedoch fundierte Prognosen auf die zu erwartenden Behandlungsergebnisse in der veterinärmedizinischen Praxis ermöglichen.

Die Ergebnisse der an 7 Erregern durchgeführten Untersuchungen zum Vergleich der antibakteriellen sowie antimykotischen Wirksamkeit von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt gleicher Provenienz und gleicher Sammelzeit bestätigten die antibakterielle Wirksamkeit der Propolis und des Pappelknospenharzes. Die antibakterielle Wirkung beider Stoffe wies in etwa die gleiche Intensität auf. Auch LAVIE (1976) testete die antibakterielle Wirkung von Extrakten aus Pappelknospen und Propolisextrakten in vitro an gleichen Erregern und kam diesbezüglich zu gleichen Ergebnissen. In den eigenen antibakteriellen Testungen erwies sich *Staphylococcus aureus* aus dem getesteten Bakterienspektrum am empfindlichsten gegen beide Stoffe.

Die in den eigenen Untersuchungen ermittelte MHK von Propolistrockenextrakt im Nährmedium für *Staphylococcus aureus* lag im Bereich der in der Literatur angegebenen MHK-Werte für diesen Erreger. Die festgestellte stärkere Empfindlichkeit der grampositiven Keime im Vergleich zu gramnegativen Keimen gegen Propolis wurde ebenfalls von Autoren wie ČIŽMÁRIK et al. (1976), MERESTA et al. (1985), MAKROSJAN et al. (1990), SERRA et al. (1995) u.a. dokumentiert. In eigenen Untersuchungen getestete gramnegative Erreger konnten in den getesteten Propolis- oder Pappelknospenharztrockenextraktkonzentrationen bis 2,8 mg/ml Nährboden nicht vollständig im Wachstum gehemmt werden. Bei *Pseudomonas aeruginosa* war aber, im Gegensatz zu *Escherichia coli*, in dieser und in niedrigeren Konzentrationen eine Wachstumshemmung durch Propolis- oder Pappelknospenharztrockenextraktzusatz im Nährboden erreichbar.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigten Propolis- wie Pappelknospenharztrockenextrakt ausgeprägte antimykotische Wirkungen auf alle getesteten Hefen und Pilze. So wurde im Bereich der getesteten Konzentration beider Extrakte bis zu 2,8 mg/ml Nährboden eine vollständige Wachstumshemmung aller getesteten Erreger erreicht. Die antimykotische Wirkung des Propolistrockenextraktes erwies sich, verglichen mit der vom Pappelknospenharztrockenextrakt, als etwas stärker auf die getesteten Erreger. Am empfindlichsten gegen beide Extrakte reagierte *Trichophyton mentagrophytes*. Dieses Ergebnis bestätigt die empirischen Erkenntnisse aus den mit Erfolg durchgeführten Behandlungen bei Trichophytie durch BARTUEW (1961), GOLOSCHAPOW (1963), LORI et al. (1986) und LORI (1990) mit propolishaltigen Medikamenten.

Die ermittelten MHK-Werte des Propolistrockenextraktes im Nährboden für *Candida albicans* lagen im Bereich der Literaturangaben von ČIŽMÁRIK et al. (1976), METZNER et al. (1977), MERESTA et al. (1985) u.a. Auf die Hefe *Malassezia pachydermatis* wirkten beide

Extrakte in gleicher Stärke. Bei einer Konzentration von 2,8 mg/ml von Propolis- oder Pappelknospenharztrockenextrakt im Nährboden wurde eine vollständige Wachstumshemmung dieses Erregers erzielt.

Die in eigenen In-vitro-Untersuchungen erzielte annähernd gleiche antibakterielle und antimykotische Wirksamkeit von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt bestätigen indirekt die von LAVIE et al. (1970), MARLETTO (1983) u.a. vertretene Meinung, daß Ausscheidungen der Knospen verschiedener Pappelarten in einigen geographischen Regionen, zu denen auch große Teile Deutschlands gehören, die Hauptgrundlage der Propolis darstellen. Andere Autoren wie PALOŞ et al. (1983), GREENAWAY et al. (1987), GARCIA-VIGUERRA et al. (1993) wiesen durch chromatographische Analysen von Propolis und Exkreten der Pappelknospen deren hohe Übereinstimmung hinsichtlich der Inhaltsstoffe nach.

Die meisten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit Propolis einer Imkerei ausgeführt. Die Bienen bezogen ihren Rohstoff stets aus der gleichen Region, also von den gleichen Rohstofflieferanten. Ausgehend von den eigenen Ergebnissen des antibakteriellen und antimykotischen Wirksamkeitsvergleiches von Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt und o.g. Autorenmeinungen könnte der Extrakt aus Pappelknospen ein Surrogat der Propolis darstellen, da die Propolis als Rohstoff zur Herstellung medizinischer Präparate nur in begrenzten Mengen zur Verfügung steht, demgegenüber die Pappelknospen in größerem Umfang vorhanden sind. Dazu bedarf es eingehender Untersuchungen beider Naturprodukte hinsichtlich der Bestandteile und vor allem ihrer biologischen Eigenschaften. Die Aktualität dieser Thematik in jüngster Zeit läßt sich anhand von Publikationen vor allem aus dem asiatischen Raum ersehen. So untersuchten z.B. LIN et al. (1993) die Inhaltsstoffe der *Populus tomentosa* auf entzündungshemmende Eigenschaften.

Da es sich bei der Propolis um ein komplexes Naturprodukt handelt, können Schwankungen des Wirkstoffgehaltes auftreten. Daher sind beim Einsatz propolishaltiger Medikamente zur Standardisierung biologische Proben notwendig, in denen bestimmte pharmakologische Wirkungen der Propolis überprüft und gesichert werden. Damit wird es ermöglicht, Empfehlungen für eine konkrete Indikation des propolishaltigen Medikamentes zu geben.

### **4.3 Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Viren**

Eine weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit war, in Konzentrationsbereichen des Propolistrockenextraktes, in denen in Zellkulturen keine oder reversible Zellschäden auftraten,

die antivirale Wirkung von Propolistrockenextrakt an einer Auswahl von tierpathogenen Viren zu überprüfen.

Hierbei wurde auf einen Vertreter aus der Familie der Herpesviridae, das equine Herpesvirus 1 (EHV 1), und einen Vertreter aus der Familie der Rhabdoviren, das Vesikulärstomatitis-Virus (VSV), zurückgegriffen. Die antivirale Wirkung von Propolistrockenextrakt auf diese Viren wurde mikroskopisch und im Plaquetest untersucht.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde ein konzentrationsabhängiger antiviraler Effekt des Propolistrockenextraktes auf die getesteten Viren festgestellt. Die stärkste antivirale Wirkung auf das EHV 1 und das VSV wurde in Konzentrationen von 125 µg/ml Nährmedium erreicht.

Die erzielten Ergebnisse sprechen für einen je nach Virusstamm unterschiedlich ausgeprägten antiviralen Effekt von Propolistrockenextrakt. Von den getesteten Viren war das EHV 1 am empfindlichsten gegen Propolistrockenextrakt. Auf das Virus der Vesikulärstomatitis (VSV) zeigte der Propolistrockenextrakt gleichfalls eine ausgeprägte antivirale Wirkung. Die Höhe der Virusmenge des Inokulums hatte dabei keinen Einfluß auf die antivirale Wirkung gleicher Propolistrockenextraktkonzentrationen.

Die Untersuchungsergebnisse bestätigen die starke antivirale Wirkung der Propolis auf die Familie der Herpesviridae. Ein antiviraler Effekt der Propolis *in vitro* auf Vertreter dieser Virusfamilie wurde u.a. von JUCU et al. (1976) auf das Grippevirus APR 8, von CRIŞAN et al. (1976) und AMOROS et al. (1992) auf das VHS 1, von KÖNIG et al. (1985, 1988) auf vogelpathogene Herpesviren und das Aujeszky-Virus sowie von KALETA (1991) auf das Taubenherpesvirus beschrieben.

Eine Bestätigung der *in vitro* erzielten Ergebnisse in der Praxis der Humanmedizin wurde durch erfolgreiche Anwendung der Propolis bei Erkrankungen wie Haut- und Genitalherpes von CIURCĂNEANU et al. (1983) und von KOLESNIKOVA (1993) bei herpesbedingten Keratitiden erbracht.

Ausgehend von den beim cELISA auf die Virusproteine gp 51 und p 24 des bovinen Leukosevirus gewonnenen Ergebnissen ist eine Hemmung der Produktion dieses Virus in der FLK/BLV-Zellkultur durch Propolistrockenextraktzusatz sehr wahrscheinlich. Mit Ausnahme von 5 µg Propolistrockensubstanz/ml Nährmedium war bei allen getesteten Konzentrationen eine Verringerung der Mengen beider Proteine gegenüber den Kontrollen meßbar.

In der Konzentration von 5 µg/ml Propolistrockenextrakt kam es zu einer Erhöhung der Menge des Proteins p 24 über den Wert der Kontrolle, beim Protein gp 51 wurde der Kontrollwert nahezu erreicht. Die Erhöhung der Proteinmengen des bovinen Leukosevirus in diesem Konzentrationsbereich lag mit großer Wahrscheinlichkeit in der durch Propolistrockenextraktzusatz zum Nährmedium der FLK-BLV-Zellkultur induzierten Erhöhung der Zellzahl, die in den mikroskopischen Untersuchungen festgestellt wurde.

Die Verringerung der Produktion von Proteinen des bovinen Leukosevirus in der FLK/BLV-Zellkultur läßt sich in Konzentrationen unter 50 µg/ml Propolistrockenextrakt nicht mit der zytotoxischen Wirkung erklären, da durch sie kaum Zellveränderungen bewirkt wurden. Es muß deshalb angenommen werden, daß ein anderer Wirkmechanismus zugrunde liegt, der zukünftig weiter abzuklären wäre. Durch die erzielten Ergebnisse an der FLK/BLV-Zellkultur, in der das BLV permanent vorlag, wurde eine durch KÖNIG et al. (1988) aufgestellte Hypothese bestätigt, daß der Hemmechanismus der Propolis eher im Bereich der Virusreplikation als im Bereich der Adsorption an der Wirtszelle zu suchen ist.

#### **4.4 Wirkung von Propolistrockenextrakt auf Zellkulturen**

Nach Auswertung und Verallgemeinerung der während der Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse lassen sich folgende Aussagen bezüglich des zytotoxischen Effekts von Propolistrockenextrakt bei den ausgewählten permanenten und nichtpermanenten Zelllinien treffen:

1. Propolistrockenextrakt rief in hoher Konzentration an allen getesteten Zellkulturen ausgeprägte zytotoxische Wirkungen hervor. Die dafür notwendigen Konzentrationen waren von der Zelllinie abhängig. Die Konzentrationen des Propolistrockenextraktes im Nährmedium, die zu vollständigem Zelluntergang führten, waren unterschiedlich hoch:

ab 140 µg/ml bei bat	(Fledermauslungenzelllinie)
ab 250 µg/ml bei HEF	(Hühnerembryofibroblasten)
ab 280 µg/ml bei ED	(equine Dermis-Zelllinie)
ab 280 µg/ml bei FLK/BLV	(fetal lamb Kidney-BLV-infiziert)

2. Der zytotoxische Effekt verlagerte sich nach 48 bzw. 72 h Inkubation in Richtung geringerer Propolistrockenextraktkonzentrationen im Nährmedium.

3. Mit der Abnahme der Propolistrockenextraktkonzentration im Nährmedium verringerten sich die zytotoxischen Effekte in den Zellkulturen.

4. Geringe Propolistrockenextraktkonzentrationen im Nährmedium der FLK/BLV-Zellkultur (<2,5µg) bewirkten eine Proliferationssteigerung.

5. Die erzielten Versuchsergebnisse zeigten eine Abhängigkeit von der jeweils benutzten Zelllinie, die sich, abgesehen von den festgestellten allgemeinen Gesetzmäßigkeiten, in ihrer spezifischen Reaktion auf die Veränderung der Propolistrockenextraktkonzentration im Nährmedium äußerten.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf permanente Zelllinien zeigte sich, daß die equine Dermis-Zelllinie (ED) am unempfindlichsten gegen Propolistrockenextrakt ist. Die Fledermauslungenzelllinie (bat) reagierte am sensibelsten. Hier traten schon bei geringen Propolistrockenextraktkonzentrationen im Nährmedium Zellveränderungen auf.

Ausgehend von den erzielten Ergebnissen dieser Versuche läßt sich schlußfolgern, daß eine Testung der antiviralen Aktivität von Propolistrockenextrakt gegen zytopathogene Viren nur auf bestimmten Zelllinien, bei denen durch Propolistrockenextraktzusatz zum Nährmedium in einem breiten Bereich keine Beeinflussung des Zellwachstums erfolgt, sinnvoll ist. Als solche Zelllinie wurde die equine Dermis-Zelllinie (ED) ermittelt.

Von Interesse ist die „selektive“ Wirkung des Propolistrockenextraktes auf verschiedene Zelllinien im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als Zytostatikum (vgl. HLADOŇ et al. 1980, ARAI et al. 1994). Ausgeprägte zytotoxische Wirkungen hoher Propolistrockenextraktkonzentrationen wurden in allen getesteten Zellkulturen festgestellt, wobei die zum vollständigen Zelluntergang führenden Propolistrockenextraktkonzentrationen verschieden hoch waren und von der jeweiligen Zelllinie abhingen.

Da die proliferationsfördernden Wirkungen von Propolistrockenextrakt auf Zelllinien kaum erforscht sind, war eine Vertiefung dieser Erkenntnisse von besonderem Interesse. Unter diesem Aspekt wurden spezielle Untersuchungen der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Proliferation von Zellkulturen durchgeführt.

Zur quantitativen Bestimmung der mikroskopisch festgestellten proliferationsstimulierenden Wirkungen niedriger Propolistrockenextraktkonzentrationen im Nährmedium der FLK/BLV-Zellkultur wurde die Messung der Menge von den Virusproteinen gp 51 und p 24 des bovinen Leukosevirus durchgeführt. Das BLV wurde in dieser Zelllinie konstant produziert. Die an der FLK/BLV-Zellkultur vorgenommenen cELISA-Messungen auf die Virusproteine gp 51 und p 24 zeigten eine maximale Erhöhung der Menge beider Proteine bei einer Propolistrockenextraktkonzentration von 5 µg je ml Nährmedium. Eine Verringerung der

Mengen beider Virusproteine in Zellkulturen mit Propolistrockenextraktzusatz gegenüber den Kontrollen bei gleichzeitigem Vorliegen einer erhöhten Anzahl von Zellen lassen darauf schließen, daß parallel zur Proliferationsstimulation eine Hemmung der Virusproduktion vorlag. Daher läßt sich die Bestimmung der in der FLK/BLV-Zellkultur gebildeten Proteinmengen bei Propolistrockenextraktzusatz zum Nährmedium nicht als Maß einer direkten Proliferationsmessung verwenden.

An der HaCaT-Zelllinie wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Propolistrockenextrakt auf die Proliferation mittels Proliferationsmessung nach der Kristallviolettmethodologie überprüft.

Mit dieser Methode gelang es, eine konzentrationsabhängige Hemmung bzw. Stimulierung der Proliferation in HaCaT-Zellkulturen nachzuweisen. Konzentrationen unter 10 µg/ml Nährmedium führten zur Stimulierung, darüberliegende zur Hemmung der Proliferation. Bei Konzentrationen von 50 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium wurde die Proliferation nach 24 h Inkubation auf 64%, nach 48 h Stunden auf 39% gegenüber den Kontrollen gesenkt. Die ausgeprägteste Proliferationserhöhung wurde bei der kleinsten getesteten Konzentration von 1µg Propolistrockenextrakt/ml Nährboden erzielt. Nach der Inkubation von 24 h wurde die Proliferation auf 141%, nach 48stündiger Inkubation auf 135% gegenüber der Kontrolle erhöht. Bei den durchgeführten Untersuchungen der Wirkung von Propolistrockenextrakt auf die Proliferation in der HaCaT-Zelllinie wurde festgestellt, daß die Proliferationsstimulierung bereits nach 24 h vollständig ausgeprägt war, während der antiproliferative Effekt nach 48 h Inkubation ausgeprägter als nach 24 h Inkubation vorlag.

Ausgehend von den eigenen Untersuchungen kann festgestellt werden, daß der Bereich der Propolistrockenextraktkonzentrationen, in dem es zu Proliferationsstimulation in einigen Zellkulturen kam, unter 10 µg/ml Nährmedium lag. Ähnliche Beobachtungen machte NEUNABER (1995) und beschrieb eine Steigerung der Proliferation von Lymphozyten in Zellkulturen bei Propolistrockenextraktkonzentrationen von 6,3 µg/ml Nährmedium.

Aus praktischer Sicht sind die zahlreichen Erfahrungen (90 Fälle) von KULEEW (1964) interessant, der in der Veterinärchirurgie bei der Anwendung von Propolissalbe bei Pferden feststellte, daß sich die Anwendung von 15%iger Salbe am günstigsten erwies, da die Anwendung einer 20%igen Salbe zu einer sehr starken Granulation führte und die Anwendung einer 10%igen den Zeitraum der Behandlung verlängerte.

Durch Extrapolation der ermittelten Werte der Proliferationsmessungen an der HaCaT-Zellkultur und der FLK/BLV-Zellkultur läßt sich der Peak der Proliferationsstimulation im Bereich zwischen 1 µg und 5 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium vermuten.

Die Hemmung der Proliferation in der HaCaT-Zellkultur in Konzentrationen von 10 bis 25 µg Propolistrockenextrakt/ml Nährmedium kann mit Sicherheit keine Folge unspezifischer zytotoxischer Effekte sein, da bei mikroskopischen Untersuchungen dieser und anderer Zelllinien in diesen Konzentrationsbereichen die Lebensfähigkeit der Zellen unbeeinflußt blieb.

Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse der experimentellen und klinischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit läßt sich abschließend feststellen, daß Propoliszubereitungen ein wirksames Therapeutikum bei Otitis externa des Hundes darstellen.

Die erzielten Ergebnisse bestätigen die antibakterielle, antimykotische sowie antivirale Wirksamkeit des Propolistrockenextraktes auf veterinärmedizinisch relevante Erreger. Es ist daher anzunehmen, daß Propoliszubereitungen auch bei anderen erregerbedingten Erkrankungen in der Veterinärmedizin mit Erfolg lokal angewendet werden könnten. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen. Pappelknospenharztrockenextrakt zeigte ebenfalls eine ausgeprägte antibakterielle und antimykotische Wirksamkeit, die in ihrer Stärke etwas unter der des Propolistrockenextraktes lag. Davon ausgehend könnte Pappelknospenharztrockenextrakt für bestimmte zu erzielende pharmakologische Wirkungen einen den Propolistrockenextrakt ersetzenden Stoff darstellen.

Propolistrockenextrakt bewirkte bei allen getesteten permanenten und nichtpermanenten Zelllinien ab einer bestimmten Konzentration im Nährmedium, deren Höhe abhängig von der jeweiligen Zelllinie war, ausgeprägte zytotoxische Wirkungen. Diese Wirkung läßt weitere Untersuchungen sinnvoll erscheinen. Weiterhin zeigte Propolistrockenextrakt eine konzentrationsabhängige Hemmung bzw. Stimulierung der Proliferation in einigen Zellkulturen. Um die Mechanismen dieser Hemmung und Stimulierung der Proliferation durch Propolis insbesondere ihrer Extrakte zu ergründen, bedarf es weiterer Untersuchungen in vitro und in vivo.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu verschiedenen Wirkungen von Propolis in vivo und in vitro durchgeführt.

Bei insgesamt 97 Otitis externa-Fällen an 51 Hunden wurden 7%ige bzw. 10%ige Zubereitungen aus ethanolischen Propolistrockenextrakt mit Glycerin bzw. Rizinusöl erfolgreich zur 1xtäglichen lokalen Behandlung eingesetzt. In 81,44 % der Fälle trat eine Heilung nach 7 Tagen ein. Nach 14 Tagen Behandlung betrug die Heilungsquote 96,90%. Innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 3 Monaten wurden keine Rezidive festgestellt.

Ethanolischer Propolistrockenextrakt wirkte dosisabhängig antibakteriell bis bakterizid auf anaerobe Bakterienstämme. Innerhalb des getesteten Keimspektrums bestanden gattungsbedingte Unterschiede in der Propolisempfindlichkeit. Alle getesteten 14 anaeroben Bakterienstämme wurden im Dilutionstest vollständig im Wachstum gehemmt. Die ermittelten MHK-Werte von ethanolischen Propolistrockenextrakt für Arten der Gattung *Fusobacterium* lagen bei 1,0 mg Propolistrockenextrakt je ml Nährboden, für die übrigen getesteten anaeroben Bakterien bei 0,5 mg/ml.

Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt (von *Populus italica*) wiesen im Dilutionstest ausgeprägte Wirkungen auf veterinärmedizinisch relevante grampositive Bakterien, Hefen und Pilze auf. Die antibakterielle Wirkung von ethanolischen Propolis- und Pappelknospenharztrockenextrakt war für grampositive Keime annähernd gleichstark ausgeprägt. Die antimykotische Wirkung vom Propolistrockenextrakt lag etwas über der vom Pappelknospenharztrockenextrakt. Die ermittelten MHK-Werte des Propolistrockenextraktes und des Pappelknospenharztrockenextraktes für grampositive Bakterien, Pilzen und Hefen lagen zwischen 0,175 bei *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes* und 2,8 mg/ml bei *Malassezia pachydermatis*. Die gramnegativen Keime *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* wurden in den getesteten Konzentrationen bis zu 2,8 mg/ml in ihrem Wachstum nicht vollständig gehemmt.

Ein konzentrationsabhängiger antiviraler Effekt des Propolistrockenextraktes wurde auf das Vesikulärstomatitis-Virus aus der Familie der Rhabdoviren und das equine Herpesvirus 1 aus der Familie der Herpesviridae nachgewiesen. Die stärkste antivirale Wirkung auf beide Viren lag bei einer Propolistrockenextraktkonzentration von 125 µg/ml Nährmedium vor. Die antivirale Wirkung des Propolistrockenextraktes auf das EHV 1 war stärker ausgeprägt als auf das VSV. Mit cELISA durchgeführte Mengemessungen der Virusproteine gp 51 und p 24 lassen eine Hemmung der Produktion des bovinen Leukosevirus durch Propolistrockenextraktzusatz zum Nährmedium der permanenten Zellkultur FLK-BLV (VAN DER MAATEN et al. 1979) als möglich erscheinen.

Alle untersuchten Zelllinien - die equine Dermis-Zelllinie (ED), die Fledermauslungenzelllinie (bat), die Hühnerembryofibroblasten-Zelllinie (HEF), die fetal lamb Kidney-Zelllinie-BLV-infiziert (FLK/BLV) und die humane Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) - zeigten bei hohen Propolistrockenextraktkonzentrationen im Nährmedium zytotoxische Effekte.

Die Höhe der Propolistrockenextraktkonzentration im Nährmedium, die zum vollständigen Zelluntergang führte, war abhängig von der Zelllinie und lag zwischen 140 µg und 280 µg. Die equine Dermis-Zelllinie (ED) zeigte sich am unempfindlichsten gegen Propolistrockenextrakt. Geringe Propolistrockenextraktkonzentrationen (unter 10 µg/ml) führten bei den Zelllinien FLK/BLV und HaCaT zur Proliferationserhöhung.

## 6 Summary

**To advise the effectiveness of Propolispreparations during Otitis externa at dogs, anyhow examinations of the antibacterial, antiviral activity of ethanol Propolis-extracts and there effect on cellular cultures**

The scientific paper on hand includes examinations to differing effects of Propolis in vitro and in vivo.

Seven per cent respectively 10 per cent dispensations ethanol Propolis-dryextract with glycerol respectively castor oils were successful put in once a day for local treatment by altogether 51 dogs with 97 otitis externa cases. There were 81,44 per cent of the cases healed after 7 days. The rate of cure reached 96,90 per cent after 14 days of treatment. There were no relapses identified within an observation period of 3 months.

Ethanol Propolis-dryextract effected dose-dependent antibacterial too bacterial on anaerobic bacterial strains. The tested germinal spectrum shows differences in the degree of sensitiveness of Propolis, conditioned by species. All 14 tested anaerobic bacterial strains completely stunted in growth by the dilution-test. The determined MIC-values of ethanol Propolis-dryextract for species of Fusobacterium were next to 1,0 mg Propolis-dryextract of each 1 ml culture, other tested anaerobic bacteria next to 0,5 mg per ml.

Propolis- and Poplarbudsdry-extract (from *Populus italica*) show pregnant effects on veterinary-medical relevant gram-positive bacteria, yeasts and funguses in the dilution-test. The antibacterial effect of Propolis- and Poplarbudsdry-extract was nearly the same on gram-positive germs. The antimycotic effect of Propolis-dryextract was a little higher, then by Poplarbuds-dryextract. The determined MIC-values of Propolis-dryextract and the Poplarbuds-dryextract by gram-positive bacteria, yeasts and mycosis had situated among 0,175 by *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes* and 2,8 mg per ml by *Malassezia pachydermatis*. The gram-negative germs *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* had not completely stunted in growth, testing concentrations till 2,8 mg per ml.

An antiviral effect depending on the concentration of Propolis-dryextract proved of Vesikularstomatitis-virus from the family of Rhabdo-viruses and equine herpes virus 1 from the family of Herpesviridae. The strongest antiviral effect on both viruses had reached with a concentration

of the the Propolis-dryextract of 125 µg per ml fluid culture medium. The antiviral effect of Propolis-dryextract on the EHV 1 was stronger marked, than on the VSV. There were quantitative determinations implemented by cELISA of the virus-proteins gp 51 and p 24. The results indicate a production-retardation of the bovine leucosis-virus by the addition of Propolis-dryextract to the fluid culture medium of the permanent cell culture FLK-BLV (VAN DER MAATEN et al. 1979).

All examined cell lines - the equine dermis cell line (ED), the bat lung cell line (bat), the fowl embryo fibroblaste cell line (HEF), the fetal lamb kidney cell line-BLV-infect (FLK/BLV) and the human immortalized cell line (HaCaT) - show cytotoxic effects, if the level of the Propolis-dryextract in the fluid culture medium was high.

The level of the Propolis-dryextract in the fluid culture medium, which lead to the complete cell-devastation depended on the cell line and amounted among 140 µg and 280 µg. The equine dermis cell line (ED) turned out most resistant to Propolis-dryextract. Small Propolis-dryextract-concentrations (below 10 µg per ml) lead by the cell lines FLK/BLV and HaCaT to a higher Proliferation.

## 7 Literatur

- ABDULLIN, H.H., KIWALKINA, W.P., BUSCHKOW, W.G. (1954)  
Letschenie nekrobazilljosa masju propolisa.  
Weterinarija **7**, 46
- ALADYSCHKIN, A. S. (1973)  
Metoditscheskie ukasanija po prigotowleniju nekotorig preparatow propolisa i primeneniju ich v veterinarii.  
Moskwa Ministerstwo selskowo hosjaistwa SSSR
- ALEKSANDROW, J.S., DANILOW, L.N. (1974):  
Bakterizidnie swoistwa propolisa.  
Ptchelowodstwo **6**, 28
- AMOROS, M., SIMOES, C. M., GIRRE, L., SAUVAGER, F., CORMIER, M. (1992)  
Synergistic effect of flavones against herpes simplex virus type 1 in cell culture.  
Comparison with the antiviral activity of propolis.  
Journal Nat.-Prod **12**, 1732-1740
- ANGELINI, G., VENA, G. A., MENEGHINI, C. I. (1987)  
Psoriasis and contact allergy to propolis.  
Contact Dermatitis **17**, 251-254
- ARAI, S., KURIMOTO, M. (1994)  
Biological effects of propolis on macrophage function and tumor metastasis.  
Honeybee Science **4**, 155-162
- ARTAMASOWA, A.W. (1974)  
Allergija k propolisu.  
Ptchelowodstwo **5**, 44
- ARVOUET-GRAND, A., LEJEUNE, B., BASTIDE, P., POURRAT, A., et al. (1993)  
Propolis extract. I. Acute toxicity and determination of acute primary cutaneous irritation index.  
J. Pharm. Belg. **3**, 165-170
- ARZUAGA, E. A., MUNOZ LARRIERA, G. (1988)  
Tratamiento de lesiones de fiebre aftosa con propoleos.  
Veterenaria Argentina **49**, 767-770
- BANKOVA, V. S., POPOV, S. S., MAREKOV, N. L. (1982)  
High-Performance-Liquid-Chromatographic Analysis of Flavonoids From Propolis.  
Journal of Chromatography **242**, 135-143
- BANKOVA, V., POPOV, S., MAREKOV, N., MANOLOVA, N. et al. (1988)  
Wrhu himiznija sastaw na njakoi frakzii na propolisa s antiwirusno deistwie.  
Acta Microbiologica Bulgarica **23**, 52-57
- BANKOVA, V., CHRISTOV, R., KUJUMGIEV, A., MARCUCCI, M. C. et al. (1995)  
Chemical composition and antibacterial activity of Braziliaqn propolis.  
Zeitschrift für Naturforschung **50c**, 167-172

- BARMENKOW, J. (1961)  
Sposobi sbora propolisa.  
Ptchelowodstwo **10**, 28
- BARSKOW, A. A., MIROLJUBOW, M. G. (1988)  
Primenenie lekarstwennich form propolisa pri akuschersko-ginekologischeskich bolesniach u korow.  
In: *Biologiya i tehnologiya produktov pchelovodstva*.  
Dnepropetrovsk Bd. 2, 118-124
- BARTUEW, W.S. (1961)  
Propolisowaja mas pri strigutschem lischae.  
Weterinarija **3**, 49
- BEKEMEIER, H., KALA, H., METZNER, J., SCHNEIDEWIND, E., SCHWAIBERGER, R. (1972)  
Zur antimykotischen und antibakteriellen Wirkung von Propoliszubereitungen.  
*Medicamentum* **4**, 110-113
- BENKOVÁ, M., BOROŠKOVÁ, Z., DUBAJ, J., SZÉCHENYI, Š. (1989)  
The immunomodulative effect of propolis preparations on guinea pigs with experimental ascariidosis.  
*Helminthologia* **26**, 163-172
- BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH (1991)  
Die Otitis externa beim Hund-eine Praxisuntersuchung.  
Boehringer Ingelheim Vetmedica aktuell
- BOITOR, I., MURESAN, E., MUNTEAN, M., MARES, N. et al. (1982)  
Observatii privind efectul produsului propolis in endometrite la vaci.  
*Buletinul Institutului Cluj-Napoca, Zootehnie si Medicina Veterinara* **36**, 73-76
- BOJNAŇSKÝ, V., KOSLJAROVÁ, V. (1975)  
Inhibierende Wirkungen der Propolis auf bestimmte Pflanzenviren.  
In: *Die Propolis*.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 53-58
- BOLTSCHAKOW, W.F. (1989)  
Propolis w dermatologi.  
Ptchelowodstwo **2**, 42-43
- BURENIN, N. L., KOTOWA, G. N. (1985)  
Sprawotschnik po ptchelowodstwu. 2. Aufl.  
Moskwa: Agropromisdat. 211-212
- CASTRO, S. L., HIGASHI, K. O. (1995)  
Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*.  
*Journal of Ethnopharmacology* **1**, 55-58
- CETRA, B. ARZUAGA, A. E. (1988)  
Accion de propoleos en la tratamiento de heridas de castration y descole en corderos.  
*Therios* **59**, 260-262

- CIESLICKI, M. (1991)  
Die Bedeutung des Kortisonanteils in Otitispräparaten- eine kritische Betrachtung von Kombinationspräparaten.  
Kleintierpraxis **36**, 140-150
- CIRASINO, L., PISATI, A., FASANI, F. (1987)  
Contact dermatitis from propolis.  
Contact dermatitis **16**, 110-111
- CIURCĂNEANU, C., CRIȘAN, I., CIOCA, V., IEȘEANU, V. et al. (1983)  
Behandlung von Haut- Genitalherpes, wie auch der Gürtelrose mit wässriger Propolislösung und mit Propolissalbe.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 415
- ČIŽMÁRIK, J., MATEL, J. (1970)  
Examination of the chemical composition of Propolis I. Isolation and Identification of the 3, 4-Dihydroxycinnamic Acid (Caffeic Acid) from Propolis.  
Experientia **7**, 713
- ČIŽMÁRIK, J., TRUPL, J. (1975)  
Propolis-Wirkung auf Hefepilze.  
Pharmazie **30**, 406-407
- ČIŽMÁRIK, J., TRUPL, J. (1976)  
Propolis-Wirkung auf Hautpilze.  
Pharmazie **1**, 55
- ČIŽMÁRIK, J., TRUPL, J. (1976a)  
Wirkung von Propolis auf Bakterien.  
Pharmazie **31**, 656-657
- CRIȘAN, I., MUTIU, A., ȘAHNAZAROV, N., CIOCA, V. et al. (1976)  
Wirkung der Propolis auf das Herpesvirus in vitro.  
In: Neues in der Apitherapie II. Internationales Apitherapie-Symposium 2.-7. September 1976, Bukarest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 194-199
- DANILOW, L.N. (1973)  
Letschenie nekotorich koschnich sabolewanii propolisom.  
Ptchelowodstvo **10**, 18
- DEREVICI, A., ATHANASIU, P., PETRESCU, A., STOIAN, M. (1975)  
Zu der Non-Onkogenizität der Propolis für Hamster: morphologische Angaben.  
In: Die Propolis.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 68-71
- DIMOV, V., IVANOVSKA, N., MANOLOVA, N., BANKOVA, V., et al. (1991)  
Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function.  
Apidologie **2**, 155-162

- DOBROWOLSKI, J. W., VOHORA, S. B., SHARMA, K., SHAH, S. A., et al. (1991)  
Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products.  
*Journal of Ethnopharmacology* **1**, 77-82
- DONADIEU, Y. (1994)  
Die Propolis. 3. Aufl.  
Oppenau: Koch Imkerei Technik-Verlag
- DOROSCHENKO, P. N. (1988)  
Opit primeneniia propolisa pri lor.saboliwaniach.  
In: *Biologiya i tehnologiya produktov pchelovodstva*. Bd. 2  
Dnepropetrovsk. 66-75
- DROEGE, G., NICOLAI, W. (1981)  
Propolis.  
*Garten und Kleintierzucht C* **20**, 13
- DROEGE, G. (1984)  
Das Imkerbuch.  
Berlin: VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag
- DUFAIT, R. (1977)  
Über die Bedeutung von *Pityrosporum canis* bei Otitis externa und Dermatitis des Hundes.  
*Kleintierpraxis* **23**, 29-30
- DURMANENKO, I.S. (1976)  
Letschenie stomatitow rastworom propolisa.  
*Ptchelowodstwo* **5**, 44
- ERSKI, B. M., VUKOVIC, D. (1990)  
Delovanje propolisa na mikrofloru genitalnog trakta krava.  
*Veterinarski Glasnik* **5**, 403-405
- ESSER, B. (1986)  
Allergy due propolis.  
*Aktuel. Dermatol.* **6**, 203-205
- FILIPOW, P.I. (1991)  
Prirodi dar bezennii.  
Stawropol: Stawropolskoe knischnoe Isdatelstwo. 131-144
- FOCHT, J., HANSEN, S., NIELES, J., van den BERG, A., et al. (1993)  
Bactericidal effect of propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infections.  
*Arzneimittelforschung* **8**, 921-923
- GAPTRACHIMANOWA, K. G. (1954)  
Propolisoterapija selskohosjaistwennich schiwotnich, bolnich nekrobazillosom.  
Kasan: Aftoreferat dissertazii na soiskanie utchennoi stepeni kandidata beterinarnich nauk.

- GARCÍA-VIGUERA, C., FERRERES, F., TOMÁS-BARBERÁN, F. A (1993)  
Study of Canadian Propolis by GC-MS and HPLC.  
Zeitschrift für Naturforschung **48c**, 731-735
- GEORGIJEWA, E., WASSILEFF, W. (1983)  
Propolis in der Behandlung der chronischer Pyelonephritis.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 422
- GHISALBERTI, E. L., JEFFRIES, P. R., LAUTERI, R. (1978)  
Constituents of propolis.  
Experientia **2**, 157-158
- GILLIES, R. J., DIDIER, N., DENTON, M.(1986)  
Determination of cell number in monolayer cultures.  
Anal. Biochemistry **159**, 109-113
- GLIŃSKI, Z., JAROSZ, J., MERESTA, T. (1987)  
Przeciwdrobnoustrojowe działanie propolisu.  
MEDYCINA WETERYNARYJNA **2**, 74-79
- GOLOSCHAPOW, I. (1963)  
Letschebnoe swoistwo propolisa.  
Ptchelowodstwo **4**, 4
- GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F. R. (1987)  
The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spektrometry.  
Proc. R. Soc. London B **232**, 249-272
- GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F. R. (1988)  
Composition of Propolis in Oxfordshire, U. K. and ist Relation to Poplar Bud Exudate.  
Zeitschrift für Naturforschung **43c**, 301-305
- GRIMM, G. (1983)  
Ein Tropfen Nektar.  
Berlin: VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. 183-185
- GROBOW, O. (1976)  
Produkti ptchelowodstwa w medizine.  
Ptchelowodstwo **2**, 26
- GRZYWA, Z., RUDZKI, E. (1979)  
Sensitization to propolis.  
Prezgl.-Dermatol. **6**, 709-711
- GUZALJUK, I.S. (1973)  
Propolisa polutschaju boltsche.  
Ptchelowodstwo **3**, 34

- GUZALJUK, I.S. (1976)  
Osenju propolis ne otbiraju.  
Ptchelowodstwo **11**, 17
- HASHIMOTO, T., TORI, M., ASAKAWA, Y., WOLLENWEBER, E. (1988)  
Synthesis of Two Allergenic Constitutes of propolis and Popolar Bud Excretion.  
Zeitschrift für Naturforschung **43c**, 470-472
- HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER, E., SENFF, H., POST, B. (1987)  
Propolis allergy (I). Origin, properities, usage and literature review.  
Contact Dermatitis **17**, 163-170
- HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER, E., SENFF, H., POST, B. (1987a)  
Propolis allergy (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester.  
Contact Dermatitis **17**, 171-177
- HEGYI, E., SUCHÝ, V., NAGY, M. (1990)  
Zur Frage der Propolisallergie.  
Hautarzt **41**, 675- 679
- HEINZE, W., HOLZ, J., KONRAD, H., NATTERMANN, H. (1996)  
Zur Wirkung von Propolis bei Otitis externa des Hundes.  
Tierärztl. Umschau **51**, 240-248
- HEINZE, W., HOLZ, J., NATTERMANN, H., BLANKENSTEIN, P. (1998)  
Zur Wirkung von ethanolischen Propolisextrakten auf einige veterinärmedizinisch relevante Bakterien, Pilze und Viren sowie auf Zellkulturen. Teil I  
Tierärztl. Umschau **53**, 274-281
- HEINZE, W., HOLZ, J., NATTERMANN, H., BLANKENSTEIN, P. (1998)  
Zur Wirkung von ethanolischen Propolisextrakten auf einige veterinärmedizinisch relevante Bakterien, Pilze und Viren sowie auf Zellkulturen. Teil II  
Tierärztl. Umschau **53**, 321-326
- HIGASHI, K. O., CASTRO, S. L. (1994)  
Propolis extracts are effective against Trypanosoma cruzi and have an impact on ist interaction with host cells.  
Journal of Ethnopharmacology **2**, 149-155
- HLADOŃ, B., BYLKA, W., ELLNAIN-WOYTASZEK, M., SKRZYPCZAK, L., SZAFAREK, P., CHODERA, A., KOWALEVSKI, Z. (1980)  
In vitro Studies on the Cytostatic Activity of Propolis Extracts.  
Arzneimittelforschung/ Drug. Res. 30(II) **11**, 1847-1848
- HOLLANDS, I., MIYARES, C., SIGARROA, A., PEREZ, A. (1984)  
Accion del propoleo sobre la intensidat de parasitacion en conejos afectados por eimerias intestinales.  
Revista Cubana de Ciencias Veterinarias **2**, 157-163

- HOLLANDS, I., MIYARES, C., SIGARROA, A., (1988)  
 Analisis comparativo entre la accion del propoleos, la sulfaquinoxalina y la sulfametacina en conejos afectados por coccidiosis.  
 Revista Cubana de Ciencias Veterinarias **2**, 99-104
- HOLLANDS, I., MIYARES, C., PIMIENTA, R. (1988a)  
 Control de la calidad de la Propolisina (extracto alcohólico de propóleos) utilizado como coccidiostático mediante un método biológico.  
 Revista Cubana Ciencias Veterinarias **4**, 319-326
- IALOMITEANU, M., NICOLAU, N., DAGHIE, V. (1976)  
 Apitherapeutische Verwendung der Propolis bei Flagellaten- und Pilzkrankheiten.  
 In: Neues in der Apitherapie II. Internationales Apitherapie-Symposium 2.-7. September 1976, Bukarest.  
 Bukarest: Apimondia-Verlag. 148-149
- IBRAGIMOWA, A. I., UGRJUMOW, W. I., HAFISOW, CH. H.P (1988)  
 Primenenie preparatov propolisa w sotchetanie s antibiotikami pri kolibakteriose teljat.  
 In: Biologiya i tehnologiya produktov pchelovodstva. Bd. 2  
 Dnepropetrovsk. 89-94
- IDRISOWA, K. G. (1964)  
 Primenenie propolisowoi masi pri nekrobazillose selskohosjaistwennih schivotnich.  
 In: Tesisi dokladov 2. leningradskoi nauschnoi konferenzii po primeneniju produktov ptchelovodstva b medizine i weterinariii.  
 Leningrad. 73
- IVANA, F. I., TATU, E., IVANA, S. P. (1991)  
 Preparate apicole in terapia chirurgicala la animale mici.  
 Zootehnie si Medicina Veterinara **1**, 29-31
- IWANOW, A.J. (1960)  
 Primenenie porosjatam propolisa kak profilaktitzeskogo i letzebnogo sredstwa.  
 Weterinarija **2**, 56
- IWLEW, A.N. (1985)  
 Is keli woskowoi.  
 Kiew. 34-37
- JANEŠ, K., BUMBA, V. (1974)  
 Beitrag zur Zusammensetzung des Bienenharzes (Propolis).  
 Pharmazie **8**, 544-545
- JIMENEZ, M. M., VIAMONTES, L. D. (1993)  
 Evaluacion de dos soluciones de propoleo en al tratamiento de endometritis puerperales en vacas.  
 Revista de Produccion Animal **3**, 153-156

- JUCU, V., GIDOIU, T., BABII, R., PALOŞ, E. (1976)  
 Untersuchung der Wirkung von Propolis und Bienenbrot bei experimenteller Grippeinfektion.  
 In: Neues in der Apitherapie II. Internationales Apitherapie-Symposium  
 2.-7. September 1976, Bukarest.  
 Bukarest: Apimondia-Verlag. 182-184
- KALETA, E. F. (1991)  
 Einfluß von Propolis der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) auf die Vermehrung einer Klein- und Groß-Plaque-Variante des Tauben Herpesvirus in vitro.  
 Tierärztliche Umschau **46**, 553-556
- KALMAN, CH. (1983)  
 Apitherapie-Erfolge in Israel.  
 In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
 Bukarest: Apimondia-Verlag. 429
- KANEEDA, J. NISHINA, T. (1994)  
 Safety of propolis. Acute toxicity.  
 Honeybee Science **1**, 29-33
- KARASEK, E. (1962)  
 Zur Behandlung der Otitis externa.  
 Monatshefte Vet.-Med. **17**, 741-742
- KARIMOWA, S. (1960)  
 Djeistwie wodnogo ekstrakta propolisa na patogennie leptospiri i blednuju treponemu.  
 Antibiotiki **5**, 122-123
- KAZAKOW, I. F., ABUSAROW, J. SCH., ARISTOW, A. A (1964.)  
 Letzenija krupnogo rogatogo skota propolisnoii masju pri jaschurnich poraschenijach.  
 In: Tesisi dokladov 2. leningradskoi nautznoj konferenzij po primeneniju produktov ptzelovodstva v medizine i veterinarii.  
 Leningrad. 70
- KEDZIA, A. (1986)  
 Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on anaerobic bacteria.  
 Herba Polonica **1**, 53-58
- KEGL, T., HUSZENICZA, G., JONSSON, P., OLAH, B., et al. (1993)  
 Antibiotikumot nem tartalmazo, uj togyinfuzio hatekonysagi es artalmatlansagi vizsgalantanak tapaszalatai III. A tiszitott propolisz hatoanyag-tartalmu togyinfuzio hatekonysaganak osszehasonlito vizsgalanta.  
 Magyar Allatorvosok Lapja **8**, 485-492
- KELLER, R. E., PRUDNITSCHENKO, E. K. (1964)  
 O sostave propolisa i ego bakterizidnosti.  
 In: Tesisi dokladov 2. leningradskoi nautschoi konferenzii po primeneniju produktov ptchelovodstva b medizine i weterinarii.  
 Leningrad. 53-54

- KHAYYAL, M. T., GHAZALY, M. A., KHATIB, A. S. (1993)  
Mechanism involved in the antiinflammatory effect of propolis extract.  
Drugs Exp. Clin. Res. **5**, 197-203
- KISS, G., SZIGETI, B., LUKATS, G., NAGY, G. (1994)  
A new combination (Otex ear drops) for the treatment of otitis externa in dogs.  
6th EAVPT Congress. August: 1994-98
- KIWALKINA, W. P. (1957)  
Propolis-effektivnii preparat pri letschenii nekrobazillesa i mnogich drugich koschnich saboliwanii masju propolisa.  
Biluttein selskohosaistvennoi informazii Ministerstwa selskogo hosaistwa TASSR  
Nr. 8.
- KIWALKINA, W. P. (1964)  
Preparati propolisa dlja weterenarii.  
Weterenarija **8**, 64-65
- KIWALKINA, W. P. (1964a)  
Propolis w weterinarii.  
Weterenarija **9**, 78-79
- KIWALKINA, W.P. (1964b)  
Propolis, ego antimikrobnie i letschebnie swoisrwa.  
Kasan: Aftoreferat dissertazii na soiskanie utchennoi stepeni doktora biologitscheskich nauk.
- KIWALKINA, W.P., BARSKOW, A. A., SELIWANOWA, A. S., LOMOWA, E. A. et al.  
(1985)  
Preparati propolisa w weterenarii.  
Weterenarija **8**, 64-65
- KIWALKINA, W.P., TURSUNALIEW, S. SCH. (1988)  
Wlijanie preparatow propolisa na estestwennuju pesistentnost krolikow.  
In: Biologiya i technologiya produktov pchelovodstwa. Bd. 2  
Dnepropetrovsk. 101-104
- KLEINHANS, D. (1987)  
Airborne contact dermatitis due to propolis.  
Contact Dermatitis **3**, 187-188
- KOKELJ, F., TREVISAN, G. (1983)  
Contact dermatitis from propolis.  
Contact Dermatitis **6**, 518
- KOLESNIKOWA, M. A. (1993)  
Propolis i virusnie zaboliewania glaz.  
Ptchelowodstwo **11-12**, 27
- KOMAROW, A. A. (1993)  
Ptchelowodstwo.  
Tula: Isdatelstwo Filin. 193-200

- KONDRACKI, M., BEDNAREK, D., BIENIEK, K. (1994)  
Przydatnosc preparatu Neopropolisvet w leczeniu zaburzen przewodu pokarmowego u cielat.  
Zycie Weterynaryjne **10**, 382-383
- KÖNIG, B., DUSTMANN, J. H. (1985)  
The Caffeyolics as a New Family of Natural Antiviral Compounds.  
Naturwissenschaften **72**, 659-661
- KÖNIG, B., DUSTMANN, J. H. (1988)  
Baumharze, Bienen und antivirale Chemotherapie.  
Naturwissenschaftliche Rundschau **2**, 43-53
- KORCSOG, M., CĂLĂUZ, S (1983)  
Toxikologische Untersuchung des standartisierten Gesamtpropolisextrakts.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 430
- KORPATSCHOW, W. W. (1989)  
Zelebnaja fauna.  
Moskwa: Nauka. 62-64
- KORTE, G. (1962)  
Der Antibiotika-Test und die Therapie der Otitis externa beim Hund.  
Kleintier Prax. **7**, 209-212
- KRAFT, W. (1990)  
Kleintierkrankheiten. Bd. 1. Innere Medizin. 2.neubearb. und erw. Aufl.  
Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer. 119-120
- KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., PIETSZ, G., et al. (1993)  
Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of Staphylococcus aureus.  
Arzneimittel Forschung **5**, 607-609
- KUJUMGIEV, A., BANKOVA, V., IGNATOVA, A., POPOV, S. (1993)  
Antibacterial activity of propolis, some components and their analogs.  
Pharmazie 48 H. **10**, 785-786
- KULEEW, F. T. (1964)  
Primenenija propolisovoi masi w hirurgi.  
In .Tsesi dokladov 2. leningradskoi nautznoj konferenzij po primeneniju produktov ptzelovodstva v medizine i veterinarij.  
Leningrad. 72
- KÜSTENMACHER, M. (1911)  
Propolis.  
Berichte der dtsh. pharm. Ges. **21**, 65-92
- LARION, M., LARION, C., MOLDOVANU, C. (1983)  
Beobachtung über die Propolisverwendung in der Gynäkologie.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 430

- LAVIE, P. (1975)  
 Das Antibiotikum der Propolis.  
 In: Die Propolis.  
 Bukarest: Apimondia-Verlag. 35-44
- LAVIE, P. (1975a)  
 Sootnoschenie meschdu propolisom, topolewimi potzkami (Popoulus sp.) i kastoreumom.  
 In: XXV. Meschdunarodnii kongres po ptchelobodstvu 8-14 sentjabrja 1975 w grenoble.  
 Bukarest: Apimondia-Verlag. 146
- LIN, M. LI, S. (1993)  
 Studies on the chemical constituents of *Populus tomentosa* Carr.  
 Acta Pharmaceutica Sinica 28(6), 437-441
- LIWSCHITZ, J. A., (1993)  
 Priodi mudrie soweti.  
 Irkutsk: Pirus. 21-24
- LORI, G. (1990)  
 Accion fungicida del propoleos en la dermatomycosis bovina.  
 Industria Apicola 1, 38-43
- LORI, G., LUCIA, G. E. (1986)  
 Accion fungicida del propoleos en la dermatomycosis bovina.  
 Medicina Veterinaria 5-6, 281-286
- LOTZE, W., RICHTER, B. (1991)  
 Klinische Untersuchung zur Wirksamkeit von Propolis bei zytostatika-induzierten Stomatitiden.  
 Medicamentum 4, 88-89
- MAČIČKA, M. RAČKOVÁ, Z (1983)  
 Propolisquantität und -Qualität abhängig vom Sammelort.  
 In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
 Bukarest: Apimondia-Verlag. 387-391
- MACHACKOVA, J. (1985)  
 Contact dermatitis to propolis.  
 Contact Dermatitis 1, 43-44
- MACHACKOVA, J. (1988)  
 The incidence of allergy to propolis in 605 consecutive patients patch tested in Prague.  
 Contact Dermatitis 4, 210-212
- MAKASCHWILI, I.A. (1974)  
 Is istorii primenenija propolisa.  
 Ptchelowodstvo 1, 44-45

- MAKROSIAN, A.A., NERESIAN, D.G. (1990)  
Propolis i mikroorganizmi.  
Ptchelowodstvo **11**, 18-19
- MANNAPOWA, R. T., KIWALKINA, W. P. (1988)  
Wlijanie na immunogenes raslitzchnich dos propolisa.  
In: Biologiya i technologiya produktov pchelovodstva. Bd. 2  
Dnepropetrovsk. 171-173
- MARLETTO, F. (1983)  
Propoliseigenheiten, abhängig von der Pflanzenherkunft und ihrer Verwendung durch die Bienen.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 431
- MARTINEZ, J. M., BERNAL, R., GONZALEZ, G. A., CASTILLO, M. E., et al. (1992)  
Aplicacion del colirio LRA-20 de propoleos en el tratamiento de terneros con queratoconjunctivitis infecciosa.  
Revista Cubana de Ciencias Veterinarias **1**, 55-58
- MAYER, M. (1990)  
Propolis a jeho využitie.  
Vcelar **64**, 53
- MERESTA, L., MERESTA, T. (1985)  
Wrażliwość na ekstrakt propolisu drobnoustrojów wywołujących mastitis u bydła w badaniach in vitro.  
MEDYCINA WETERYNARYJNA **8**, 489-492
- MERESTA, L., MERESTA, T., BURDZIŃSKI, J., CHMURZYŃSKI, P. (1989)  
Leczenie mastitis u bydła ekstraktem propolisu.  
MEDYCINA WETERYNARYJNA **7**, 392-395
- METZNER, J., BEKEMMEIER, H., SCHNEIDEWIND, E., SCHWAIBERGER, R. (1975)  
Bioautographische Erfassung der antimikrobiell wirksamen Inhaltsstoffe von Propolis.  
Pharmazie **12**, 799-800
- METZNER, J., SCHNEIDEWIND, E. M. (1976)  
Chemisch-analytische, mikrobiologische und pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen an Propolis und seinen Inhaltsstoffen.  
Halle/Saale, Univ. Diss A
- METZNER, J., SCHNEIDEWIND, E.-M., FRIEDRICH, E. (1977)  
Zur Wirkung von Propolis und Pinocembrin auf Sproßpilze.  
Pharmazie **32**, 730
- METZNER, J., BEKEMEIER, H., PAINTZ, M., SCHNEIDEWIND, E. (1979)  
Zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Propolis und Propolisinhaltsstoffen.  
Pharmazie **32**, 97-102

- METZNER, J., BEKEMEIER, H., SCHNEIDEWIND, E.-M., WENZEL, U. (1979a)  
Pharmakokinetische Untersuchungen des Propolisinhaltsstoffes Pinocembrin.  
Pharmazie **34**, 185-187
- MINEDSCHJAN, G. .Z. (1996)  
Sbornik po narodnoi medizine i netradicionalnim sposobam letzenija. 2. Aufl.  
Moskwa: Bagira. 281-290
- MINKOW, S.G., PLOTNIKOW, I.S. (1983)  
Sprawotznik ptchelowoda. 3. Aufl.  
Alma Ata: Isdatelstwo Kainar. 33-34
- MIROLYUBOW, M. G., BARSKOW, A.A. (1980)  
Propolis i mastit.  
Weterenarija **2**, 45-46
- MITRO, S. (1996)  
Information zu Honig und anderen Bienenprodukten aus medizinischer und  
mikrobiologischer Sicht.  
Tierärztliche Umschau **51**, 232-240
- MONACHOWA, S. I. (1976)  
O bakteriostatitscheskom deistwie propolisa.  
Ptchelowodstwo **7**, 30-31
- MONTI, M., BERTI, E., CARMINATI, G., CUSINI, M. (1983)  
Occupational and cosmetic dermatitis from propolis.  
Contact Dermatitis **2**, 163
- MUHA, K., MUHA, H. (1988)  
Plotnost propolisa opredeljaem na paseke.  
Ptchelowodstwo **7**, 30-31
- MÜLLER, E., HEUSINGER, A. (1994)  
Mikrobiologische Ergebnisse von Ohrtrupfern bei Hund und Katze.  
Tierärztliche Praxis **22**, 80-84.
- MUNOZ, L. G. (1989)  
Prevention of legs affections in ovines using propolis.  
Apiacta **3**, 80-81
- NERSESJAN, D: G. (1989)  
Antimikrobnaja aktiwnost propolisa.  
Biologitscheskii schurnal armenii **7 (42)**, 694-696
- NEUNHABER, E. (1995)  
Phytochemische und mikrobiologische Untersuchungen von Propolis verschiedener  
Provenienzen als Beitrag zur Kenntnis der Wirkprinzipien in Propolis.  
Inaugural-Dissertation; Berlin.

- NEYCHEW, H., DIMOV, V., VULEVA, V., SHIROVA, L. et al. (1988)  
Immunomodulatory action of propolis II. Effect of water-soluble fraction on influenza infection in mice.  
*Acta Microbiologica Bulgarica* **23**, 58-62
- NICKLAS, W., MUMME, J. (1979)  
Mykologische und bakteriologische Untersuchungen zur Keimflora bei der Otitis externa des Hundes.  
*Tierärztliche Umschau* **34**, 606-615
- OLESCHKO, L. N., BELONOGOWA, B. P. (1991)  
Uralskii propolis i ego preparati.  
*Ptchelowodstwo* **11**, 10-11
- OMAROW, SCH. M., MINKAILOW, K. M. (1988)  
Propolis i bronhialnaja astma.  
*Ptchelowodstwo* **7**, 31
- PAINTZ, M., METZNER, J. (1979)  
Zur lokalanästhetischen Wirkung von Propolis und einigen Inhaltsstoffen.  
*Pharmazie* **34**, 839-841
- PALMBACHA, S. E. (1970)  
Isutchenija wlijanija propolisa na kischetschnuju mikrofloru i nekotorie fiziologitscheskie i immunologitscheskie pokazatili.  
Kasan: Aftoreferat dissertazii na soiskanie utchennoi stepeni kandidata biologitscheskich nauk.
- PALOŠ, E., CIUCU, N., CONSTANTINESCU, E. (1983)  
Untersuchung der aktiven Propolisprinzipien.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 446
- PEPELJNJAK, S., JALŠENJAK, I., MAYSINGER, D. (1982)  
Growth Inhibition of *Bacillus subtilis* and Composition of Various Propolis Extracts.  
*Pharmazie* **37**, 864-865
- PESCHANSKIJ, A. H. (1963)  
Propolis i ego swoistwa.  
*Ptchelowodstwo* **11**, 44-45
- PESCHANSKIJ, A. H. (1970)  
Propolisnoe aerosolnoe letschenie.  
*Ptchelowodstwo* **3**, 38
- PESCHANSKIJ, A. H. (1973)  
Letschenie nekotorig sabolewanii rastworom propolisa.  
*Ptchelowodstwo* **5**, 38
- PESCHANSKIJ, A. H. (1974)  
Opit primeneniya propolisa pri jaswennoi bolesni.  
*Ptchelowodstwo* **11**, 24

- PESCHANSKIJ, A. H. (1976)  
Elektrofores propolisa.  
Ptchelowodstwo **12**, 33
- PHILIPP, P. W. (1928)  
Das Kittharz, seine Herkunft und Verwendung im Bienenhaushalt.  
Biol. Zent. bl. **12**, 705-714
- PLATZER, C. H., SIAKKOU, J., SOBER, J., KOPP, J. (1990)  
Identification of an immunodominant region on the isolated bovine leukemia virus (BLV) major envelope protein gp51 by monoclonal antibodies presumably not exposed during natural BLV infection.  
Acta virol. **34**, 246-255
- POPESCU, V., PĂUNESCU, T., VELESCU, G., MAFTEI, I. (1976)  
Bestimmung der Aktivität der anaeroben Transhydrogenasen und der Wasserstofffreisetzenden Substanzen der Propolis.  
In: Neues in der Apitherapie II. Internationales Apitherapie-Symposium 2.-7. September 1976, Bukarest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 194-199
- POPRAWKO, S. A. (1975)  
Chemische Zusammensetzung der Propolis, ihre Herkunft und Standartierungsfragen.  
In: Die Propolis.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 19-22
- POPRAWKO, S. A. (1976)  
Himitscheskaja i biologitscheskaja priroda propolisa.  
Ptchelowodstwo **5**, 39-41
- POPRAWKO, S. A. (1976a)  
Rastitelnie istotschniki propolisa.  
Ptchelowodstwo **7**, 38-41
- POPRAWKO, S. A. (1976b)  
Metodi himitscheskogo isledowanija propolisa.  
Ptchelowodstwo **9**, 34-36
- POPRAWKO, S. A. (1976c)  
Proishoschdenija propolisa gipotesi i fakti.  
Ptchelowodstwo **12**, 28-30
- POPRAWKO, S. A. (1989)  
Ptchela na zvetke.  
Moskwa: WO Agropromisdat. 241-248
- RIMBAUD, E., CHAFFER, M. (1987)  
El propoleos en la clinica de politraumatizados.  
Veterinaria Argentina **33**, 272-275

- RODE, M., VONČINA, D., HERMAN, O., MIHELIČ, A. M. (1983)  
Wirkung des Propolisextraktes auf die Wundheilung.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 452
- ROMANOW, A. (1961)  
Primenenija propolisa pri trihomoniose plemennih bikow.  
Weterinarija **5**, 72
- ROMVARY, A., SZITA, G., CSIKO, G., GASPAR, Z., et al. (1993)  
Antibiotikumot nem tartalmazo, uj togyinfuzio hatekonysagi es artalmatlansagi vizsgalantanak tapaszatalai IV. Az uj togyinfuzio artalmatlansagi vizsgalanta.  
Magyar Allatorvosok Lapja **8**, 493-497
- RÖSCH, G. A. (1927)  
Beobachtungen an Kittharz sammelnden Bienen.  
Biol. Zent. Bl. **2**, 113-121
- SCHELASCHSKIJ, W. A. (1964)  
Resultati primenenija propolisa pri sabolevanii vimeni u korov jaschurum.  
Tsesi dokladov 2. leningradskoi nautznoj konferenzij po primeneniju produktov ptzelovodstva v medizine i veterinarij.  
Leningrad. 76
- SCHELLER, S., SZAFLARSKI, J., TUSTANOWSKI, J., NOLEWAJKA, E.,  
STOJKO, A. (1977)  
Biological properties and clinical application of propolis.  
I. Some physico- chemical properties of propolis.  
Arzneimittelforschung/Drug. Res. 27 (I) **4**, 889-890
- SCHELLER, S., TUSTANOWSKI, J., FELUS, E., STOJKO, A. (1977a)  
Biological properties and clinical application of propolis.  
VII. Investigation of immunogenic properties of ethanol extract of propolis (EEP).  
Arzneimittelforschung/Drug. Res. 27 (II) **12**, 2342
- SCHELLER, S., LUCIAK, M., TUSTANOWSKI, J. et al. (1977b)  
Biological properties and clinical application of propolis.  
III. Investigation of the sensitivity of Staphylococci isolated from pathological cases to ethanol extract of propolis (EEP) attempts on inducing resistance in laboratory Staphylococcus strain to EEP.  
Arzneimittelforschung/Drug. Res. 27 (II) **7**, 1395
- SCHELLER, S., STOJKO, A., SZWARNOWIECKA, J., TUSTANOWSKI, J.,  
OBUSZKO, Z. (1977c)  
Biological properties and clinical application of propolis.  
VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration.  
Arzneimittelforschung/Drug. Res. 27 (II) **11**, 2138-2140

- SCHELLER, S., ILEWICZ, L., LUCIAK, M., SKROBIDURSKA, D., STOJKO, A., MATUGA, W. (1978)  
Biological properties and clinical application of propolis.  
IX. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on dermal pulp regeneration.  
*Arzneimittelforschung/Drug. Res.* 28 (I) **2**, 289-291
- SCHELLER, S. PAWLAK, F. (1981)  
Anwendung von Propolis-Extrakten in der Medizin.  
*Heilkunst* **4**, 222-233
- SCHNEIDEWIND, E. M., KALA, H., LINZER, B., METZNER, J. (1975)  
Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe der Propolis.  
*Pharmazie* **12**, 803
- SCHNEIDEWIND, E.-M., BÜGE, A., KALA, H., METZNER, J., ZCHUNKE, A. (1979)  
Identifizierung eines aus Propolis isolierten, antimikrobiell wirksamen Inhaltsstoffes.  
*Pharmazie* **34**, 103-106
- SCHULER, M., FROSCH, P. J. (1988)  
Kontaktdermatitis auf Propolis (Bienen-Kittharz).  
*Der Hautarzt* **3**, 139-142
- SCUPIN, E., SCUPIN, E. (1971)  
Ein Beitrag zur Otitis des Hundes.  
*Kleintierpraxis* **16**, 4-11
- SELHOSISDAT (1962)  
Wremenie rekomendazij po primeneniju propolisa w weterinariii.  
Moskwa: Isdatelstwo selskohosjaistwennoi literaturi, schurnalow i plakatow
- SERRA, J., ESCOLA, R. (1995)  
Studie über die bakteriostatische Aktivität von Propolis.  
*Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **8**, 242-246
- STAROSTENKO, E. W. (1968)  
Propolisowanie gnesd ptchelamie rasnich ras.  
*Ptchelowodstwo* **7**, 30
- STARZYK, J., SCHELLER, S., SZAFLARSKI, J. et al. (1977)  
Biological properties and clinical application of propolis.  
II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extracts of propolis (EEP).  
*Arzneimittelforschung/Drug. Res.* 27 (II) **6**, 1198-1199
- STEINER, H. (1968)  
Antibiotika im Bienenstaat.  
*Imkerfreund* **11**, 344
- STELLMACHER, W., DONATH, R. (1986)  
Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Ohrtupferproben von Hunden.  
*Monatshefte Vet.-Med.* **41**, 415-417

- STOJKO, A., SCHELLER, S., SZWARNOWIECKA, J., TUSTANOWSKI, J., OSTACH, H.,  
OBUSZKO, Z. (1978)  
Biological properties and clinical application of propolis.  
VIII. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on  
the regeneration of bone tissue.  
*Arzneimittelforschung/Drug. Res.* 28 (I) **1**, 35-37
- SUMANO, L. H., CAMBERROS, L. O., OCAMPO, A. A. (1989)  
Evaluacion comparativa de la mezcla propoleo zabila con cicatrizantes comerciales.  
*Veterinaria Mexico* **4**, 407-414
- SZÜCS, A. (1983)  
Propolis-anwendung in der Humantherapie.  
In: *Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.*  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 454
- TAKAISI-KIKUNI, N. B., SCHILCHER, H. (1994)  
Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism  
of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance.  
*Planta Med* **60**, 222-227
- TETEREW, I., USHAKOW, V. (1992)  
Propolis stimulirujet rost kur.  
*Ptchelowodstvo* **6**, 14-15
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A., FERRERES, F., TOMÁS-LORENTE (1993)  
Flavonoids from *Apis mellifera* Beeswax.  
*Zeitschrift für Naturforschung* **48c**, 68-72
- TOSTI, A., CAPONERI, G. M., BARDAZZI, F. (1985)  
Propolis contact dermatitis.  
*Contact Dermatitis* **4**, 227-228
- TREVISAN, G., KOKELJ, F. (1987)  
Contact dermatitis from propolis: role of gastrointestinal absorption.  
*Contact dermatitis* **16**, 48
- TSCHEMODANOWA, L. E., TSCHANUSCHEW, Z. G. (1989)  
Propolis pri saboewanijah organow srenija.  
*Ptchelowodstvo* **11**, 45
- TSCHIRKUNOW, I. P. (1961)  
Letchenie ptchel propolisom.  
*Ptchelowodstvo* **12**, 41
- TURSUNALIEW, S. SCH. (1985)  
Propolis s dibiomizinom pri kolibakteriose jagnjat.  
*Weterinarija* **10**, 64

- TZAKOFF, T. (1975)  
Untersuchung der lokalbetäubenden Eigenschaften der Propolis und ihre Wirkung bei Operationen von Schafen und Hunden.  
In: Die Propolis.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 58-62
- VAGIN, E. A., ZWETKOWA, R. P. (1992)  
Raswodite ptchel w litschnich hosjaistwach.  
Moskwa: Irius.
- VALI, L. (1983)  
Physikalische und chemische Propolisuntersuchung.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 454-455
- VAN DER MAATEN, M. J., MILLER, J. M. (1976)  
Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures.  
Bibliography Haematologica **43**, 360-362
- VERZÁR, G., KUTAS, J., BAKOS, P., LEMBERKOVICS, É, et al. (1983)  
Einige Propolisbestandteile und ihre mikrobiologische Aktivität.  
In: Der XXIX. Internationale Bienenzüchterkongress in Budapest.  
Bukarest: Apimondia-Verlag. 455
- VILLANUEVA, V. R., BOGDANOVSKY, D., BARBIER, M. et al. (1964)  
Sur L' Isolation Et L' Identification De La 3, 5, 7-Trihydroxy Flavone (Galangin) A Partir De La Propolis.  
Ann. Inst. Pasteur **106**, 292-302
- VILLANUEVA, V. R., BOGDANOVSKY, D., GONNET, M. et al. (1970)  
Les Flavonoides De La Propolis Isolement D' une Nouvelle Substance Bacteriostatique: La Pinocembrine (Dihydroxy-5, 7 Flavanone).  
Ann. Inst. Pasteur **118**, 84-87
- VINTILA, C., POLVEREJAN, S., CRISAN, I., SKURKA, R., et al. (1980)  
Eficacitatea comparativa a unor metode de tratament utilizate in pododermatita infectioasa a oilor.  
Seria Medicina Veterinaria **17**, 115-119
- WAHONINA, T. E. (1989)  
Propolis: sbor i hranenie.  
Ptchelowodstwo **6**, 39-41
- WAHONINA, T. W., BODROWA, R. N., DUSCHAKOWA, E. S. (1976)  
Kontrol katzestwa propolisa i perespektivi standartisazii.  
Ptchelowodstwo **5**, 42-44
- WALKER, P., CRANE, E. (1987)  
Constituents of Propolis.  
Apidologie **18**, 327-334

- WALLMANN, J., MARX, M. (1990)  
Wirksamkeit von Surolan® bei der Therapie der Otitis Externa des Hundes.  
Der praktische Tierarzt 71 (8), 16-21
- WINOGRADOWA, T. W., ZAITZEWA, G. P. (1964)  
Ptchela i sdorowje tscheloweka. 2. Aufl.  
Moskwa: Rosselhosizdat. 240-278
- WOLLENWEBER, E., CHADENSON, M., HAUTEVILLE, M. (1973)  
Ein natürliches Flavonol-Acetat im Knospenöl von Pappelarten.  
Zeitschrift für Naturforschung **28c**, 638-640
- WOZNIAK, K. D., BRAUN, W. (1972)  
Erste Ergebnisse der Behandlung mit Propolis-Lösung (Mylyt®) bei Mykosen und  
Ekzemen.  
Medicamentum **4**, 114-116
- YOUNG, E. (1987)  
Sensitivity to propolis.  
Contact Dermatitis **16**, 49-50

## 8 Veröffentlichungen

W. HEINZE, J. HOLZ, H. KONRAD und H. NATTERMANN (1996)

Zur Wirkung von Propolis bei Otitis externa des Hundes

Tierärztl. Umschau 51, 240-248

J. HOLZ (1996)

Untersuchungen zur Wirkung von Propolis-Extrakten auf veterinärmedizinisch relevante Viren und Tumorzelllinien

Referat im Forum Veterinärphytotherapie (Bonn am 4. 10. 1996)

W. HEINZE, J. HOLZ, H. NATTERMANN und P. BLANKENSTEIN (1998)

Zur Wirkung von ethanolischen Propolisextrakten auf einige veterinärmedizinisch relevante Bakterien, Pilze und Viren sowie auf Zellkulturen Teil I

Tierärztl. Umschau 53, 274-281

W. HEINZE, J. HOLZ, H. NATTERMANN und P. BLANKENSTEIN (1998)

Zur Wirkung von ethanolischen Propolisextrakten auf einige veterinärmedizinisch relevante Bakterien, Pilze und Viren sowie auf Zellkulturen Teil II

Tierärztl. Umschau 53, 321-326

# 9 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Jan Holz

geboren am 30. Mai 1966 in Moskau

Familienstand: ledig

## Schulbildung

1973 - 1975

Schule bei der Botschaft der DDR in Moskau

1975 - 1983

3. Polytechnische Oberschule Berlin Lichtenberg

## Berufsausbildung

1983 - 1985

Berufsausbildung mit Abitur im VEG(Z)  
Tierzucht Jürgenstorf  
Berufsabschluß Zootechniker

1985 - 1986

Abitur an der Arbeiter-und-Bauern-Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle/ Saale

1986 - 1988

Grundwehrdienst bei der NVA

## Hochschulausbildung

1988 - 1990

Veterinärmedizinische Fakultät der Moskauer  
Veterinärakademie

1990 - 1994

Veterinärmedizinische Fakultät der Humboldt-  
Universität zu Berlin

03. 1994

Staatsexamen

04. 1994

Approbation

seit 05. 1994

Doktorant am Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

## Berufliche Tätigkeit

04. 1996 - 06. 1996

Mitarbeiter in der kurativen Praxis Dr. Konrad  
in Veitshöchheim

07. 1997

eigene kurative Praxis in Alt-Friedrichsfelde 21,  
Berlin Lichtenberg

05. 1999

Bezug neuer Räume in Alt-Friedrichsfelde 102,  
Berlin Lichtenberg

## 10 Danksagung

Ich danke herzlich Herrn Prof. Dr. W. Heinze für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine fachliche Beratung, die umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen und der Abfassung der Arbeit sowie für die mir vermittelten Kontakte und Materialien.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Nattermann und den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität danke ich für die fachliche Unterstützung und das vielfältige Entgegenkommen bei der Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen.

Mein Dank gilt Frau Dr. P. Blankenstein aus dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin für die große Hilfsbereitschaft auf dem Gebiet der virologischen Untersuchungen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Tier- und Umwelthygiene des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und Herrn Priv. Doz. Dr. J. Schultz danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der mykologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. H. Konrad danke ich für die kollegiale Unterstützung bei der praktischen Erprobung der Propoliszubereitung in der Therapie von Otitispatienten und für viele anregende Diskussionen.

Desweiteren möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. Dr. C. Geilen für die Unterstützung bei den Untersuchungen im Laboratorium der Haut- und Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin am Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn M. Wolff für die Lösung computertechnischer Probleme sowie allen Freunden, die mich bei der Fertigstellung der Arbeit vielfältig unterstützt haben.