University of Mosul
College of Veterinary Medicine

The vascular and molecular effects of cloprostenol in a model of chorioallantoic membrane of chick's embryo

Nabaa khalid Abdullah

Ph.D. / Dissertation

Veterinary Medicine / Veterinary Pharmacology

Supervised

By

Professor **Professor**

Dr.Mohammed Khalid Shindala **Dr.Nashaat Ghalib Mustafa**

2023 A.D. **1445 A.H.**

Summary

We have conducted an experiment (Detecting the antiangiogenic effects of cloprostenol at doses of 7.5, 15, 22.5 and 30µg /egg locally on chick embryo - chorioallantoic membrane on the sixth day of incubation using model (CAM) to understand the mechanism of action of cloprostenol as anti-angiogenic effects. The group treated with cloprostenol (22.5 µg /egg) showed distinct anti-angiogenic effects represented in the inhibition of vascular arborization (reduction of the density) of blood vessels of CAM compared with other doses.

By monitoring the anti-angiogenic effects (lowering vascular arborization of (CAM) at times 45, 60 and 120 minutes after treating with cloprostenol at the doses (0 (control), 7.5, 15, 22.5 and 30µg /egg) on the sixth day of incubation, the group treated with the drug (22.5 µg /egg) showed that the anti-angiogenic effects remained until 60 minutes after treatment with the drug compared to other groups (7.5, 15 and 30µg /egg), where this effect ended in 60 minutes after treatment .

To reveal the mechanism of cloprostenol in inducing anti-angiogenic effects, we performed an analysis of vascular endothelial growth factor *(VEGF)- gene expression levels* in CAM by using Real-Time polemerase chain reaction assay at a dose (22.5 µ/ egg) on the sixth day of incubation because it was superior dose in this effect (anti-angiogenic) in compared with other doses, as mentioned above . This experiment recorded a decrease in the level of VEGF - *gene expression* to (0.850) fold, one hour after the treatment of (CAM), this decrease indicates that cloprostenol has antiangiogensis effects.

When conducting the same experiment mentioned above, but on the ninth day of incubation, there was also a decrease in the level of gene expression of the

VEGF, but after 2 hours. It is worth noting that this decrease was not accompanied by a distinct rise in the gene expression of the VEGF as on the sixth day.

With regard to an experiment to detect the vascular effects of cloprostenol 7.5, 15, 22.5 and 30µg / egg, topically on CAM on the ninth day of incubation, the treated group with a dose (22.5 µg / egg) showed superiority over other doses (7.5, 15 and 30µg / egg) by returning the average diameter of blood vessels of the first type to (CAM) to the pre-treatment value after it was significantly reduced by cloprostenol, which was accompanied by the occurrence of severe hemorrhage in the blood vessels of the second and third types of (CAM) .

For the purpose of investigating the role of angiotensin II receptor in the vascular effects of cloprostenol such as bleeding , we conducted this experiment (Using the interaction between valsartan (angiotensin receptor blockers) and cloprostenol. Pre-treatment of CAM with valsartan and then cloprostenol led to the prevention of bleeding, compared to the group treated with cloprostenol alone, this result indicates the participation of angiotensin II receptor in the vascular effects of cloprostenol.In addition, the interaction between valsartan and cloprostenol was synergistic on level of anti-angiogenic effects, because both drugs have anti-angiogenic effects.

To confirm that cloprostenol has anti-angiogenic effects, ethanol (210 mg/egg, topically on CAM) on the ninth day of incubation was used as a model to induce angiogensis. The result of this experiment confirmed that cloprostenol at dose (15,30 µ/egg) had effects against ethanol-induced angiogensis.

For the purpose of investigating the role of nitric oxide(NO doner) in the mechanism of action of cloprostenol, the NO donor drug (nitroglycerin) was chosen.pre-treatment of CAM with nitroglycerin (NO donor) (500 µ/egg,

topically on CAM) on the ninth day of incubation and then cloprostenol (22.5 µ/egg) led to the prevention of bleeding, compared to the group treated with cloprostenol alone, accompanied by a synergistic interaction between nitroglycerin and cloprostenol at the level of anti-angiogenic effect .This result confirmed the role of NO in the mechanism of action of the cloprostenol which includes luteolysis of the corpus luteum into the corpus albicans (white body) and does not turn into a hemorrhagic body .

جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

التأثيرات الوعائية والجزيئية للكلوبروستينول في نموذج الغشاء اللقانقي-المشيمي لأجنة بيض الدجاج

نبأ خالد عبدالله

أطروحة دكتوراه فلسفة
الطب البيطري / الأدوية البيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتور
محمد خالد شندالة

الأستاذ الدكتور
نشأت غالب مصطفى

١٤٤٥هـ
٢٠٢٣م

الخلاصة

لقد أجرينا تجربة (الكشف عن التأثيرات المضادة لتولد الأوعية للكلوبروستينول بجرعات (7.5 ، 15 ، 22.5 و 30 ميكروغرام / بيضة) في اليوم السادس من الحضانة باستخدام نموذج غشاء جنين الفرخ - الغشاء اللقانقي المشيمي من أجل فهم آلية عمل الكلوبروستينول وعلاقته بالتأثيرات المضادة لتولد الأوعية. أظهرت المجموعة المعالجة بالكلوبروستينول (22.5 ميكروغرام / بيضة) تأثيرات مميزة مضادة لتولد الأوعية تتمثل في تثبيط التشجير الوعائي (تقليل كثافة) الأوعية الدموية مقارنة بالجرعات الأخرى.

من خلال مراقبة التأثيرات المضادة لتولد الأوعية (خفض التشجير الوعائي في الاوقات45 و 60 و 120 دقيقة بعد العلاج بالكلوبروستينول بجرعات (0 (سيطرة) ، 7.5 ، 15 ، 22.5 و 30 ميكروغرام / بيضة) في اليوم السادس من الحضن ، أظهرت المجموعة المعالجة بالدواء (22.5 ميكروغرام / بيضة) أن التأثيرات المضادة لتولد الأوعية بقيت حتى 60 دقيقة بعد العلاج بالدواء مقارنة بالمجموعات الأخرى (7.5 ، 15 و 30 ميكروغرام / بيضة) ، حيث انتهى هذا التأثير في 60 دقيقة بعد العلاج .

للكشف عن آلية عمل الكلوبروستينول في إحداث التأثيرات المضادة لتولد الأوعية ، أجرينا تحليلا لمستويات التعبير الجيني لعامل نمو بطانة الأوعية الدموية باستخدام تقنية تفاعل البوليمراز المتسلسل بجرعة (22.5 ميكروغرام / بيضة) في اليوم السادس من الحضن لأنها كانت أعلى جرعة اظهرت هذا التأثير (التأثيرالمضاد للاوعية الدموية) مقارنة بالجرعات الأخرى ، كما ذكر أعلاه. سجلت هذه التجربة انخفاضا في مستوى التعبير الجيني لعامل نمو بطانة الاوعية الدموية إلى (0.850) ضعف ، بعد ساعة واحدة من العلاج على الغشاء اللقانقي المشيمي. يشير هذا الانخفاض إلى أن الكلوبروستينول له تأثيرات مضادة لتكوين الأوعية الدموية.

عند إجراء نفس التجربة المذكورة أعلاه ، ولكن في اليوم التاسع من الحضن ، كان هنالك أيضا انخفاض في مستوى التعبير الجيني لعامل نمو بطانة الاوعية الدموية ، ولكن بعد 2 ساعة. تجدر الإشارة إلى أن هذا الانخفاض لم يكن مصحوبا بارتفاع واضح في التعبير الجيني لعامل نمو بطانة الاوعية الدموية كما في اليوم السادس.

فيما يتعلق بتجربة الكشف عن التأثيرات الوعائية للكلوبروستينول (7.5 ، 15 ، 22.5 و 30 ميكروغرام / بيضة ، موضعيا على الغشاء اللقانقي المشيمي في اليوم التاسع من الحضن ، أظهرت المجموعة المعالجة بجرعة (22.5 ميكروغرام / بيضة) تفوقا على الجرعات الأخرى

(7.5 و 15 و 30 ميكروغرام / بيضة) عن طريق إعادة متوسط قطر الأوعية الدموية من النوع الأول إلى قيمة ما قبل المعالجة بعد أن تم تقليله بشكل كبير بواسطة الكلوبروستينول ، والذي رافقه حدوث نزيف حاد في الأوعية الدموية من النوعين الثاني والثالث على الغشاء اللقانقي المشيمي .

لغرض تحري دور مستقبلات الأنجيوتنسين II في التأثيرات الوعائية للكلوبروستينول مثل (النزيف) ، أجرينا هذه التجربة (استخدام التداخل بين الفالسارتان (حاصرات مستقبلات الأنجيوتنسين) والكلوبروستينول. أدت المعالجة المسبقة مع الفالسارتان ثم الكلوبروستينول إلى منع حدوث النزيف ، مقارنة بالمجموعة المعالجة بالكلوبروستينول وحده ، تشير هذه النتيجة إلى مشاركة مستقبلات الأنجيوتنسين II في التأثيرات الوعائية للكلوبروستينول. بالإضافة إلى ذلك ، كان التداخل بين الفالسارتان والكلوبروستينول تآزريا على مستوى التأثيرات المضادة لتولد الأوعية الدموية ، لأن كلا العقارين لهما تأثيرات مضادة لتولد الأوعية الدموية.

للتأكد من أن الكلوبروستينول له تأثيرات مضادة لتولد الأوعية الدموية ، تم استخدام الإيثانول (210 مجم / بيضة ، موضعيا على الغشاء اللقانقي المشيمي) في اليوم التاسع من الحضن كنموذج للحث على تكوين الأوعية الدموية. أكدت نتيجة هذه التجربة أن الكلوبروستينول (15,30 ميكروغرام / بيضة) كان له تأثيرات ضد تولد الأوعية الناجم عن الإيثانول.

لغرض التحقق من دور NO في آلية عمل الكلوبروستينول ، تم اختيار الدواء المانح NO (النتروجليسرين).أدت المعالجة المسبقة بالنتروجليسرين (NO مانح) (500 ميكروغرام / بيضة ، موضعيا على الغشاء اللقانقي المشيمي) في اليوم التاسع من الحضن ثم الكلوبروستينول (22.5 ميكروغرام / بيضة) إلى منع حدوث النزف ، مقارنة بالمجموعة المعالجة بالكلوبروستينول وحده ، يرافقه تفاعل تآزري بين النتروجليسرين والكلوبروستينول على مستوى التأثير المضاد لتولد الأوعية الدموية . أكدت هذه النتيجة دور NO في آلية عمل الكلوبروستينول الذي يتضمن انحلال الجسم الأصفرالى الجسم الأبيض ولا يتحول إلى جسم نزفي.