



Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
University of Baghdad  
College of Dentistry



***IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF BONE  
SIALOPROTEIN, BONE MORPHOGENIC PROTEIN 4  
TO EVALUATE THE LOCAL APPLICATION OF BONE  
SIALOPROTEIN / AMELOBLASTIN ON BONE  
HEALING ON RATS***

A Thesis submitted to the council of the College of Dentistry/ University of Baghdad in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Oral Histology

By

**Mayada Kamel Jaafer**

B.D.S., M.Sc.

Supervised by:

**Assist.Prof. Dr. Enas Fadhil Kadhim**

B.D.S., M.Sc., PhD. (Oral Histology)

2022 A.D.

1443 A.H.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Bone defect healing is a process of reconstruction of the bone tissue, which commonly go through a multidimensional procedure with an overlapping timeline. Proteins of the extracellular matrix often have multiple functions to facilitate complex tasks ranging from signaling to structural support. Ameloblastin (AMBN) is an enamel matrix protein produced by ameloblasts. Bone sialoprotein (BSP) is an acidic, non-collagenous glycoprotein abundantly expressed in mineralized tissues. Although is frequently used as a marker of osteoblast differentiation. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is one of the main local contributing factors in callus formation in the early phase of fracture healing. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of BSP and BMP4 as bone formation markers in experimental and control groups during bone healing and to evaluate the effect of ameloblastin, bone sialoprotein and their combination on bone healing by means of histological and histomorphomerial analysis.

**Materials and methods:** In this study forty-eight albino male rats, weighting (300-400) gram, aged (6-8) months were used. The animals were subject for a intra bony defect of about (1.8mm) in medial side of tibia bone. The animals were divided into following groups:

A . **Control group** contain 12 rats the bone defect were treated with absorbable hemostatic sponge.

B . **Experimental group** include

- **Group I** contains 12 rats, the bone defect were treated with 30 µl ameloblastin fixed by absorbable hemostatic sponge .A group

- **Group II** contain 12 rats, the bone defect were treated with 30 µl of bone sialoprotein fixed by absorbable hemostatic sponge. B group

- **Group III** contain 12 rats, the bone defect were treated with combination of 30 µl ( 15 µl ameloblastin and 15 µl bone sialoprotein) fixed by absorbable hemostatic sponge. AB group

Every single group composed of 12 rats that study in three periods 1, 2 and 4 weeks (4 rats for each period). Histological examination was performed under light microscope for all bone section stained with Hematoxylin and Eosin with assessment of histomorphometric analysis include counting of bone cells (osteoblasts, osteocytes and osteoclasts) and measured trabecular number, trabecular area and bone marrow area by image J software. Also immunohistochemical test for the expression of bone sialoprotein and bone morphological protein4 were performed on bone specimens of the studied groups.

**Results:** Histological finding of the present study illustrated that treatment with ameloblastin and bone sialoprotein induced earlier bone formation, mineralization and maturation of bone defects in comparison to control. Histomorphometric analysis for all bone parameters examined in this study, showed variation in significance among all groups in all durations.

Immunohistochemical finding showed positive expression of bone sialoprotein by osteoblasts and osteocytes was highly significant but non-significant in osteoclast between groups at 1week, while positive expression of bone morphogenic protein4 by osteoblasts, osteocytes and osteoclast was highly significant between groups at 1 week.

Immunohistochemical findings of bone sialoprotein and bone morphogenic protein4 showed increased positive expression in bone marrow stromal cells, osteoblasts and osteocytes in combination group than those other groups especially in 1 week duration.

**Conclusion:** The study revealed that combined application of ameloblastin and bone sialoprotein was more effective in enhancement of bone regeneration and in acceleration of bone healing process. In addition to increase in positive expression to bone sialoprotein and bone morphogenic protein4 of experimental group especially in combination group.



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة بغداد  
كلية طب الاسنان



دراسة كيميائية مناعية نسيجية لسيالوبروتين العظمي ولبروتين تكوين العظام -  
4 لتقييم التطبيق الموضوعي لسيالوبروتين العظمي / اميلو بلاستين في تعزيز  
شفاء العظام على الجرذان

اطروحة مقدمة الى كلية طب الاسنان-جامعة بغداد كجزء من متطلبات نيل شهادة  
الدكتوراه في انسجة الفم

من قبل

الدكتورة ميادة كامل جعفر

بكالوريوس طب وجراحة الفم والاسنان

ماجستير انسجة الفم

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتورة ايناس فاضل كاظم

ماجستير انسجة الفم

دكتورة انسجة الفم

## الخلاصة

**المقدمة:** التئام عيب العظام هو عملية إعادة بناء أنسجة العظام، والتي تمر عادة من خلال إجراء متعدد الأبعاد مع جدول زمني متداخل. غالبًا ما يكون للبروتينات المصفوفة خارج الخلية وظائف متعددة لتسهيل المهام المعقدة التي تتراوح من إرسال الإشارات إلى الدعم الهيكلي. اميلوبلاستين هو بروتين مصفوفة المينا تنتجه خلايا اميلوبلاست. سيالوبروتين العظمي (BSP) هو بروتين سكري حمضي غير كولاغيني يتم التعبير عنه بكثرة في الأنسجة المعدنية. على الرغم من استخدام BSP بشكل متكرر كعلامة لتمييز الخلايا المكونة للعظم. يعد بروتين تكوين العظام -4 (BMP4) أحد العوامل المحلية الرئيسية المساهمة في تكوين الكالس في المرحلة المبكرة من التئام الكسور. إن الهدف من هذه الدراسة هو التقييم النسيجي المناعي الكيميائي من خلال الاجسام المضادة BSP و BMP4 كعلامات تكوين العظام في المجموعات التجريبية والسيطرة أثناء التئام العظام و دراسة تأثير التطبيق الموضعي لاميلوبلاستين مع سيالوبروتين العظمي بشكل منفصل او مشترك على ترسب العظام في الجرذان عن طريق التحليل النسيجي والقياس النسيجي.

**المواد والطرق:** في هذه الدراسة ثمانية وأربعون من ذكور الجرذان البيضاء وزن (300-400) جرام تتراوح أعمارهم (6-8) أشهر. خضعت الحيوانات لعملية جراحية في الجانب الإنسي من عظم القصبة. تم تقسيم الحيوانات إلى المجموعات التالية:

أ . مجموعة السيطرة تحتوي على 12 جرذًا، الحفرة العظمية عولجت بإسفنجة جراحية قابلة للامتصاص.  
ب . تشمل المجموعة التجريبية

- المجموعة الأولى تحتوي على 12 جرذًا ، الحفرة العظمية عولجت بـ 30 ميكرو لتر من أميلوبلاستين مثبت بإسفنجة جراحية قابلة للامتصاص. مجموعة أ

- المجموعة الثانية تحتوي على 12 جرذًا ، الحفرة العظمية عولجت بـ 30 ميكرو لتر من سيالوبروتين العظمي مثبت بإسفنجة جراحية قابلة للامتصاص. مجموعة ب

- المجموعة الثالثة تحتوي على 12 جرذًا ، الحفرة العظمية عولجت بمزيج من 30 ميكرو لتر (15) ميكرو لتر من أميلوبلاستين و 15 ميكرو لتر من سيالوبروتين العظمي) مثبتة بإسفنجة جراحية قابلة للامتصاص. مجموعة أ ب

تتكون كل مجموعة واحدة من 12 فأرًا تدرس في ثلاث فترات 1 و 2 و 4 اسابيع (4 فتران لكل فترة). تم إجراء الفحص النسيجي تحت المجهر الضوئي لجميع الاقسام العظمية المصبوغة بمادة الهيماتوكسيلين والايوسين مع تحليل القياس النسيجي الشكلي لجميع انواع الخلايا العظمية والعدد الصفيحات العظمية ومساحة المنطقة الصفيحات العظمية ومساحة منطقة نخاع العظم ، كما تم اجراء اختبارنسيجي كيميائي

## الخلاصة

مناعي لظهور عامل سيالوبروتين العظمي و بروتين تكوين العظام -4 للعظام على عينات عظام المجموعات المدروسة.

**النتائج:** أشارت النتائج النسيجية لهذه الدراسة أن العلاج بالأميلوبلاستين وسيالوبروتين العظمي تسبب في تكوين العظام في وقت مبكر ، وتكلس ونضج عيوب العظام مقارنة بالسيطرة. أظهر التحليل النسيجي لجميع متغيرات العظام التي تم فحصها في هذه الدراسة تبايناً في الأهمية بين جميع المجموعات في جميع الفترات.

أما نتائج الكشف المناعي النسيجي الكيميائي لسيالوبروتين العظمي على الخلايا العظمية المصبوغة بشكل ايجابي وقد بينت بشكل اساسي احصائيا ماعدا الخلايا الاكله للعظم التي لم تظهر دلالة احصائية في الاسبوع الاول بعد العلاج بين المجموعات. بينما يظهر دلالة احصائية على الخلايا العظمية جميعا المستجيبة لبروتين تكوين العظام -4 في الاسبوع الاول بدون استثناء .

أظهرت نتائج الكشف المناعي النسيجي الكيميائي لسيالوبروتين العظمي ولبروتين تكوين العظام -4 زيادة في التعبير الإيجابي في خلايا انسجة نخاع العظم والخلايا العظمية في المجموعة المركبة مقارنةً بالمجموعات الأخرى خاصةً في الاسبوع الاول.

**الخلاصة:** كشفت الدراسة أن التطبيق المشترك لاميلا بلاستين و سيالوبروتين العظمي كان أكثر فاعلية في تعزيز تجديد العظام وتسريع عملية التئام العظام. بالإضافة إلى زيادة في التعبير الإيجابي لسيالوبروتين العظمي ولبروتين تكوين العظام -4 من المجموعة التجريبية خاصة في المجموعة المركبة.