



**Evaluation of Chitosan Derived from Marine and  
Freshwater Crustaceans' Shells on Accelerating  
Bone Healing  
(An Experimental Study on Sheep)**

A Thesis Submitted

By

Hani Mohsin Khlaif  
B.D.S, M.Sc

To The Council of the College of Dentistry, University of Mosul  
As a Partial Fulfillment of the Requirements  
For Ph.D. Degree of Dental Science  
(Oral Surgery)

Supervised by

**Lect.Dr.Mohammed K. Hasouni**  
B.D.S, F.D.S.R.C.P.S.

## SUMMARY

**Aims of study:** This study aimed to prepare chitosan from freshwater crabs and marine shrimps, test its physicochemical properties, evaluate its biocompatibility and its effect in accelerating bone healing in surgically created bone defects in sheep radiographically( by using Image J program) and histopathologically.

**Materials and Methods:** This study was divided into In vitro (laboratory) study and In vivo study on sheep. **In vitro (laboratory) study:** the chitosan was prepared from two different crustaceans shell sources, the first source was freshwater crab shell and the second source was marine shrimp shell. The shells were removed from the body of crustaceans, cleaned, dried and grinded into small particles which were sieved to get particles size of approximately one millimeter. The chitosan was extracted and isolated by processing the powder by three chemical steps. The first step was ***Demineralization step*** by using 10% acetic acid solutions mixed with 1% hydrochloric acid (HCl) solutions. The second step was ***Deproteinization step*** by refluxing of demineralized samples in 4% sodium hydroxide solutions at 100°C with a solution to solid ratio of 10 ml/g and at this step chitin was extracted. The final step was ***Deacetylation of chitin to chitosan*** by processing of chitin with 50% NaOH solution under autoclaving conditions (15 psi/121 °C) for 30 minutes with a solution to solid ratio of 10 ml/g. The viscosity- average molecular weight, surface morphology of chitosan and degree of deacetylation of all three chitosan samples were determined by using Ubbelohde viscometer, scanning electron microscopy (Vega3Tescan) and Fourier-transform spectrometer (FT-IR) respectively. **In vivo study:** Five healthy male sheep were included in the experiment. Each sheep model

was to serve as four observation subgroups where each limb in the same sheep represented a specific observation period and according to a pre-planned sacrifice schedule. In each limb, four monocortical defects were created, three filled with three chitosan samples of different sources and one defect left empty for negative control. Chitosan tissue responses in addition to its effect on accelerating bone healing were evaluated radiographically and histopathologically at two, four, six and eight weeks post-surgical intervals.

**Results:** viscosity-average molecular weights of imported, crab derived and shrimp derived chitosan were 165577, 152055, and 110408 g/mol at 25°C respectively. Degree of deacetylation (DDA%) of these three chitosan samples was 57%, 54%, 52% respectively. The morphological investigation of chitosan samples revealed smooth and compact surface of shrimp derived chitosan while the morphological surface of crab derived chitosan appeared irregular with uneven folds. In this study, radiographically there was a trend of greater radiopacity (represented by increase in mean gray scale) in all chitosan filled bone defects when comparing with negative control bone defects. Histopathologically, more osteoid tissue formation was observed at fourth, sixth and eighth postoperative periods in all chitosan filled bone defect in comparison with negative bone defects.

**Conclusions:** It was concluded from this study that both freshwater crab and marine shrimp were good sources of chitin with higher yield of chitin in shrimp source than crab. The chitosan was concluded to be a natural biocompatible biomaterial enhancing and accelerating bone formation.



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل

كلية طب الاسنان

## تقييم الكايتوسان المشتق من القشريات البحرية والنهرية في تعجيل التئام العظام

(دراسة تجريبية على الاغنام)

أطروحة تقدم بها

هاني محسن خليف

B.D.S, M.Sc

إلى

مجلس كلية طب الأسنان - جامعة الموصل

كجزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

في

علوم طب الاسنان /جراحة الفم

بإشراف

م.د. محمد خليل حسوني

B.D.S, F.D.S.R.C.P.S

## الملخص

**الاهداف:** هدفت الدراسة الحالية إلى تحضير مادة الكايتوسان من السلطعون (السرطان) الذي يعيش في المياه العذبة والروبيان البحري الذي يعيش في مياه البحار واختبار خصائصه الفيزيائية والكيميائية وتقدير استجابة النسيج العظمي للكايتوسان وتأثيره الحيوي على تسريع التئام العظام في عيوب جراحية معمولة في سيقان الضأن الامامية والخلفية باستخدام التصوير الشعاعي ( باستخدام برنامج Image J) والمرضي النسيجي.

**مواد وطرائق البحث:** الدراسة خارج الجسم: تم إعداد الكايتوسان من قشور مصدرين مختلفين من الحيوانات القشرية ، وكان المصدر الأول قشور السرطان الذي يعيش في المياه العذبة والمصدر الثاني كان من قشور الروبيان البحري. تمت إزالة القشور من جسد القشريات وتنظيفها وتجفيفها وطحنها إلى جسيمات صغيرة ثم تمت غربلتها للحصول على جسيمات ذات حجم 1 مم تقريباً. تم استخراج الكايتوسان وعزله عن طريق معالجة المسحوق بواسطة ثلاث خطوات كيميائية. الخطوة الأولى كانت لازالة المعادن باستخدام 10% محلول حمض الخليك ممزوج مع 1% محلول حمض الهيدروكلوريك (حمض الهيدروكلوريك). الخطوة الثانية كانت خطوة إزالة البروتين عن طريق ارتجاع عينات من المعادن في 4% محلول هيدروكسيد الصوديوم عند 100 °C وبنسبة 10 مل محلول / غرام مادة صلبة وفي هذه الخطوة تم استخراج الكايتين. الخطوة الأخيرة فكانت عملية (deacetylation) للكايتين وتحويله إلى الكايتوسان من خلال معالجة الكايتين مع 50% محلول هيدروكسيد الصوديوم تحت ظروف التعقيم (15 رطل / 121 درجة مئوية) لمدة 30 دقيقة وبنسبة محلول الى ماد صلبة هي 10 مل / غم. تم تحديد متوسط الوزن الجزيئي باستخدام اللزوجة ، الشكل السطحي للكايتوسان ودرجة (deacetylation) لجميع عينات الكايتوسان الثلاث باستخدام مقياس اللزوجة (Ubbelohde) ، مطياف الأشعة تحت الحمراء- إر (بروكر) والمجهر الإلكتروني المجهرى (Vega3Tescan) على التوالي.

الدراسة داخل الجسم الحي: وشملت التجربة خمسة أغانم ذكور صحية. وكان كل نموذج من الأغانم بمثابة أربع مجموعات فرعية للمراقبة حيث يمثل كل ساق في الأغانم فترة مراقبة محددة ووفقاً لجدول زمني مخطط له مسبقاً. في كل ساق تم إنشاء أربعة عيوب ، ثلاثة عيوب ملئت بثلاثة عينات من الكايتوسان المستخلص من مصادر مختلفة و عيب واحد ترك فارغ (السيطرة). استجابة الأنسجة للكايتوسان بالإضافة

إلى تأثيره على تسريع شفاء العظام تم تقييمها باستخدام الفحص الشعاعي والفحص النسيجي للعيوب التي تمثل الفترات مابعد الجراحة اثنين، أربعة، ستة وثمانية أسابيع .

**النتائج:** متوسط الوزن الجزيئي باستخدام اللزوجة للكايتوسان المستورد والمستخرج من السلطعون والروبيان 165577، 152055، و 110408 غرام / مول عند 25 درجة مئوية على التوالي. درجة DDA % لعينات الكايتوسان الثلاث كانت 57%، 52%، 54% على التوالي. كشف الفحص السطحي لعينات للكايتوسان المستمد من الروبيان سطح أملس ومدمج في حين يبدو الشكل السطحي للكايتوسان المستمد من السلطعون بشكل غير منتظم مع طيات متفاوتة. في هذه الدراسة، كان هناك اتجاه أكبر للرادايوباسيتي (ممثلة بزيادة في متوسط المقياس الرمادي) في جميع العيوب العظمية المملوثة بالكايتوسان عند مقارنتها مع العيوب العظمية بدون وضع الكايتوسان ( السيطرة السلبية). بالنسبة للفحص النسيجي فقد لوحظ تكوين أكثر للنسيج العظمي في الفترات الرابعة والسادسة والثامنة مابعد العملية الجراحية في كل العيوب العظمية المملوثة بالكايتوسان بالمقارنة مع العيوب العظمية بدون وضع الكايتوسان.

**الاستنتاجات:** وقد استنتج من هذه الدراسة أن كلا من سلطعون المياه العذبة والروبيان البحري هما مصدران جيدان للكايتين مع قابلية إنتاج الكايتين في مصدر الروبيان أكثر من السلطعون. وقد تم استنتاج ان الكايتوسان مادة موجودة في الطبيعة ومتوافقة حيويًا وتساعد في تسريع تشكيل العظام.