



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



**THE IMPACT OF BIOMIMETIC CHITOSAN,  
NANOHYDROXYAPATITE AND OZONATED  
WATER, ON ARTIFICIAL WHITE SPOT LESION  
AND *STREPTOCOCCUS MUTANS* GROWTH  
(An *in vitro* study)**

A thesis submitted to the Council of College of Dentistry at the  
University of Baghdad, in partial fulfillment of requirements for the degree  
of Doctor of Philosophy in Preventive Dentistry

By

**Fatima Saeed Jafer Al-Ward**

B.D.S., M.Sc., Preventive Dentistry

Supervised by

**Assist. Prof. Dr. Nada Jafer MH. Radhi**

B.D.S., M.Sc., Ph.D., Preventive Dentistry

2023 A.D.

1444 A.H.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Dental caries is still a major problem throughout the world, despite the introduction of several anti-caries products. The development of dental caries primarily involves *Streptococcus mutans* as a causative agent. Consequently, managing pathogenic microorganisms, and encouraging remineralization are the main goals of preventing caries. This study was designed to investigate the effect of chitosan solution, nanohydroxyapatite suspension, the combined chitosan/Nano hydroxyapatite suspension, and ozonated water alone and followed by the aforementioned test agents on the artificial white spot lesion and *Streptococcus mutans* growth.

**Materials and Methods:** This study included ninety sound extracted human maxillary first premolars, two teeth were used for Scanning Electron Microscope examination of sound and demineralized enamel, while the other (88) teeth were allocated into 8 groups: (1) control; (2) chitosan; (3) nanohydroxyapatite; (4) ozonated water; (5) ozonated water then chitosan; (6) ozonated water then nanohydroxyapatite; (7) combined chitosan/Nano hydroxyapatite and (8) ozonated water plus combined chitosan/Nano hydroxyapatite. In each group, one tooth was examined by scanning electron microscope while the remaining (10) teeth were used for DIAGNOdent, surface microhardness and energy dispersive spectroscopy.

Testing the sensitivity of *Streptococcus mutans* to different concentration of chitosan solution, nanohydroxyapatite suspension and ozonated water was performed using agar well diffusion technique.

**Results:** A statistical increase in microhardness was seen after treatment with all agents (except for control), the group that received ozonated water plus combined chitosan/ Nano hydroxyapatite showed the greatest increase in microhardness, while the group that received ozonated water alone showed the least. The results of energy dispersive spectroscopy

examination showed that after treatment an increase in calcium (Ca) percentage was noticed in all groups except in control. SEM analysis of the enamel surface revealed the disappearance of the enamel's normal architecture following demineralization. After treatment with tested agents except control group, most of micro pores were occluded. No differences in the scores of DIAGNOdent was present between sound and demineralized stage. The result of agar well diffusion method shows that the maximum diameter being in 5 mg/ml chitosan concentration which wasn't differ significantly from 0.2% chlorhexidine. For Nano hydroxyapatite and ozonated water results showed that there were no inhibition zones, for all concentrations used.

**Conclusion:** The combination of chitosan and nano hydroxyapatite revealed promising as a caries management in vitro. Chitosan at concentration of 5 mg/ml has the same potency as 0.2% chlorhexidine.

## الخلاصة

**المقدمة:** على الرغم من إستحداث منتجات مختلفة لمكافحة تسوس الأسنان، لا يزال تسوس الأسنان سائداً في جميع أنحاء العالم . تعتبر المكورات العقدية الطافرة من العوامل الأساسية المسببة لنشوء وتطور تسوس الأسنان ، لذلك فإن الوقاية من تسوس الأسنان يركز على البكتيريا المسببة اضافة الى تعزيز اعدة التمعدن. لذا صممت هذه الدراسة لدراسة تأثير محلول الكيتوسان ، هيدروكسي اباتيت النانوي ، الكيتوسان / هيدروكسي اباتيت النانوي ، ماء الأوزون وحده ومع كل مادة من مواد الاختبار المذكورة أعلاه على تسوس المينا الابتدائي المختبري. كما هدفت الدراسة الى اختبار حساسية المكورات العقدية الطافرة *Streptococcus mutans* لتركيزات مختلفة من الكيتوسان ، هيدروكسي اباتيت النانوي وماء الأوزون.

**المواد وطرق العمل :** تضمنت هذه الدراسة تسعين سن بشري من الضواحك الأولية للفك العلوي خالي من التسوس ، تم استخدام اثنين من الأسنان لفحص المجهر الإلكتروني لمينا سن سليم واخر منزوع المعادن (بعد إنشاء تسوس المينا الابتدائي المختبري) ، بينما تم تقسيم الأسنان الأخرى (88) بشكل عشوائي إلى 8 مجموعات من 11 عينة لكل منها: (1) مجموعة السيطرة (بدون علاج)؛ (2) مجموعة الكيتوسان. (3) مجموعة النانو هيدروكسي اباتيت ؛ (4) ماء الأوزون؛ (5) الماء المعالج بالأوزون ثم الكيتوسان ؛ (6) ماء الأوزون ثم مجموعة النانو هيدروكسي اباتيت ؛ (7) الجمع بين الكيتوسان / النانو هيدروكسي اباتيت و (8) ماء الأوزون ثم جمع الكيتوسان / نانو هيدروكسي اباتيت . في كل مجموعة ، تم فحص سن واحد بواسطة المجهر الإلكتروني بينما تم استخدام (10) أسنان المتبقية لقياسات جهاز التألق الليزري (DIAGNOdent pen) ، اختبار الصلادة السطحية والتحليل الطيفي المشتت للطاقة. كما اختبرت حساسية المكورات العقدية الطافرة *Streptococcus mutans* للتركيز المختلفة لمحلول الكيتوسان ومعلق نانو هيدروكسي اباتيت والماء المعالج بالأوزون .

**النتائج:** اظهرت البيانات ان هناك زيادة ملحوظة في الصلادة لجميع المجموعات بدرجة عالية بعد العلاج بعوامل مختلفة ، مع فرق معنوي كبير (باستثناء المجموعة الضابطة). كما حصلت الزيادة في متوسط النسب الذرية للكالسيوم لجميع المجموعات عدا المجموعة الضابطة وقد تم تسجيل أقصى زيادة في المجموعة المعالجة بالكيتوسان / النانو هيدروكسي اباتيت المركب بعد ماء الأوزون بينما أظهرت المجموعة المعالجة بماء الأوزون وحده أقل زيادة في الصلادة و في نسبة الكالسيوم.

كما تم تقييم سطح المينا نوعياً عن طريق المجهر الإلكتروني الماسح حيث اوضح حدوث تغييرات في تركيبية المينا بداية من فقدان البناء الهيكلية الطبيعي بعد انشاء تسوس المينا البدائي المختبري الى سد معظم المسام الدقيقة وإعادة بناء عيوب سطح المينا بنمط مختلف في كل المجموعات المعالجة بمواد الدراسة باستثناء المجموعة الضابطة .

اما نتائج استخدام جهاز التألق الليزري فقد اوضحت عدم وجود اي فرق بين القراءات الأولية و قراءات بعد انشاء تسوس المينا الابتدائي المختبري.

أظهرت نتيجة طريقة الانتشار من الحفر في الوسط البكتيري أن منطقة التثبيط تزداد مع زيادة تركيز الكيتوسان مع أقصى قطر يكون في تركيز 5 مجم / مل من الكيتوسان التي لم تكن تختلف اختلافاً كبيراً عن 0.2% كلور هيكسيدين.

**الاستنتاجات:** ان اسخدام الكيتوسان / النانو هيدروكسيباتيت المركب يعد علاجاً واعداً للتحكم في التسوس في الدراسة المختبرية خاصة بما يتمتع به الكيتوسان من تأثير مضاد للبكتيريا .

اما فيما يتعلق بحساسية المكورات العفوية الطافرة لمواد الدراسة ، فان الكيتوسان بتركيز 5 ملغ / مل فقد وجد ان له نفس فعالية 0.2% كلور هيكسيدين .



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



تأثير الكيتوسان ، النانو هيدروكسي أباتايت وماء الأوزون، على تسوس  
المينا الأبتدائي وعلى بكتريا المكورات العقديّة الطافرة (دراسة مختبرية)

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

من قبل

فاطمة سعيد جعفر الورد

بكالوريوس طب وجراحة الفم والاسنان

ماجستير طب الأسنان الوقائي

بإشراف

أ.م.د. ندى جعفر الشيخ راضي

دكتوراه طب الأسنان الوقائي