

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕМИНЕРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАЧАЛЬНОГО КАРИЕСА ЭМАЛИ

А.Л. Голованенко¹, Е.В. Третьякова¹, Е.С. Патлусова²,
И.В. Алексеева¹, Е.С. Березина¹, Р.Г. Першина³

¹Кафедра фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации», 614990, Пермь, Полевая, 2

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Пермского края,
«Краевая детская клиническая больница», 614066, г. Пермь, ул. Баумана, 22

³Кафедра стоматологии факультета ДПО ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера,
614990, Пермь, Петропавловская, 30
E-mail: annagolovanenko@yandex.ru

Одним из перспективных направлений профилактики кариеса зубов является реминерализующая терапия, направленная на нормализацию минерального состава зубной эмали. В результате комплекса, проведенных научно – экспериментальных и клинических исследований, разработаны гель и пленки лекарственные для лечения кариеса эмали. **Цель работы** – исследование реминерализующей активности лекарственных форм для лечения начального кариеса эмали. **Материалы и методы.** В качестве активных фармацевтических субстанций в лекарственных формах использовали – кальция хлорид (ФС 42-0006-5675-04 Р.003964.01), калия фосфат двузамещенный (ФС 42-1297-79), натрия фторид (ФС.2.2.0013.15), вспомогательные вещества – гелеобразователь натрий-карбоксиметилцеллюлозу (натрий-КМЦ) С75 (ТУ 6-55-39-90), пластификатор глицерин (ФС.2.2.0006.15), воду очищенную (ФС.2.2.0020.15). Исследование реминерализующей активности проводили методом определения кальция и фосфора в золе эмали *in vitro*. Количественное определение кальция проводили методом обратного комплексонометрического титрования, фосфора – методом фотоэлектроколориметрии. Также проведено электрометрическое исследование *in vivo* путем определения электропроводности эмали с помощью аппарата «Дентэст» (Геософт). **Результаты и обсуждение.** Метод определения кальция и фосфора в золе эмали *in vitro* основан на озолении зуба и последующим определением в нем кальция и фосфора химическими и инструментальными методами. На основании полученных результатов установлено, что гель и пленки лекарственные для лечения кариеса эмали, достоверно повышают содержание кальция и фосфора в эмали зуба. Проведенное электрометрическое исследование подтвердило повышение твердости структуры эмали после применения пленок лекарственных, вследствие ее реминерализации. **Заключение.** В результате проведенных исследований *in vivo* и *in vitro* установлено, что разработанные лекарственные формы оказывают реминерализующий эффект и могут быть рекомендованы для повышения эффективности профилактики и лечения начального кариеса эмали.

Ключевые слова: кариес, эмаль, гель, пленки лекарственные, реминерализация

Для цитирования:

Голованенко А.Л., Третьякова Е.В., Патлусова Е.С., Алексеева И.В., Березина Е.С., Першина Р.Г. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕМИНЕРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАЧАЛЬНОГО КАРИЕСА ЭМАЛИ. Фармация и фармакология. 2018;6(4):380-388. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-380-388 © Голованенко А.Л., Третьякова Е.В., Патлусова Е.С., Алексеева И.В., Березина Е.С., Першина Р.Г., 2018

For citation:

A.L. Golovanenko, E.V. Tretyakova, E.S. Patlusova, I.V. Alekseeva, E.S. Berezina, R.G. Pershina. STUDY OF REMINERALIZING ACTIVITY OF DOSAGE FORMS FOR TREATMENT OF INITIAL ENAMEL CARIES. Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(4):380-388. (In Russ). DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-380-388 (In Russ.)

STUDY OF REMINERALIZING ACTIVITY OF DOSAGE FORMS FOR TREATMENT OF INITIAL ENAMEL CARIES

**A.L. Golovanenko¹, E.V. Tretyakova¹, E.S. Patlusova², I.V. Alekseeva¹,
E.S. Berezina¹, R.G. Pershina³**

¹Department of Pharmaceutical Technology of Perm State Pharmaceutical Academy,
2, Polevaya Str., Perm, 614990

²Regional Children's Clinical Hospital,
22, Bauman Str., Perm, 614066

³Department of dentistry, faculty of FVE (further vocational education),
30, Petropavlovskaya Str., Perm, 614990
E-mail: annagolovanenko@yandex.ru

One of the most promising areas of dental caries prophylaxis is remineralizing therapy aimed at normalizing the mineral composition of tooth enamel. As a result of a set of scientific, experimental and clinical studies, gels and drug films for the treatment of enamel caries have been developed. **The aim** of this work is to study remineralizing activity of dosage forms for the treatment of initial enamel caries. **Materials and methods.** As active pharmaceutical substances in dosage forms, calcium chloride (FS 42-0006-5675-04 P.003964.01), potassium phosphate disubstituted (FS 42-1297-79), sodium fluoride (PS.2.2.0013.15), auxiliary substances – gelling agent sodium-carboxymethylcellulose (sodium-CMC) C75 (TU 6-55-39-90), plasticizer glycerin (PS.2.2.0006.15), purified water (PS.2.2.0020.15) – have been used. Remineralizing activity was studied by the method of determination of calcium and phosphorus in the enamel ash *in vitro*. The study of remineralizing activity was carried out by the method of determination of calcium and phosphorus in the enamel ash *in vitro*. Quantitative determination of calcium was carried out by reverse complexometric titration, and the one of phosphorus was carried out by photoelectrocolorimetry. The electro-metric study of the enamel electrical conductivity was also carried out *in vivo* with the help of the Dentest device (Geosoft). **Results and discussion.** The method of determination of calcium and phosphorus in the enamel ash *in vitro* is based on tooth ashing and the subsequent determination of calcium and phosphorus in it by chemical and instrumental methods. Basing on the results obtained, it has been established that gel and drug films used for enamel caries treatment significantly increase the content of calcium and phosphorus in tooth enamel. The conducted electrometric study confirmed the increase in the hardness of the enamel structure due to its remineralization after the use of drug films. **Conclusion.** As a result of the studies conducted *in vivo* and *in vitro*, it has been established that the developed dosage forms have a remineralizing effect and can be recommended for increasing the effectiveness of prevention and treatment of the initial enamel caries.

Keywords: caries, enamel, gel, drug films, remineralization

ВВЕДЕНИЕ. Проблема кариеса зубов на сегодняшний день представляет серьезную медицинскую и социальную проблему. В структуре стоматологических заболеваний кариес и его осложнения занимают 95,5%. Прогрессирующее поражение твердых тканей зуба, осложняющееся воспалением пульпы и околоверхушечных тканей, становится причиной острых болей, нередко приводит к утрате зубов и может явиться источником заболеваний опорно-двигательного аппарата и внутренних органов [1, 2]. Одним из перспективных направлений профилактики кариеса зубов является remineralizing терапия, направленная на нормализацию минерального состава зубной эмали и заключающаяся в профессиональной обработке зубов специальными препаратами. С помощью remineralizing терапии можно насытить эмаль ионами кальция, фосфора, фторида и др., устранить деминерализованные участки зубной эмали, вызванные процессом деминерализации, а также воздействием профилактических средств, предотвратить поражение эмали, обусловленное вымыванием минеральных элементов из твердых тканей зубов

[3–6]. В результате комплекса, проведенных научно – экспериментальных исследований на кафедре фармацевтической технологии ПГФА, разработаны гель и пленки лекарственные для лечения кариеса эмали [7–12].

ЦЕЛЬЮ настоящей работы являлось исследование remineralizing активности лекарственных форм для лечения начального кариеса эмали.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для создания аппликационных лекарственных форм (ЛФ) в качестве активных фармацевтических субстанций использовали – кальция хлорид (ФС 42-0006-5675-04 P.003964.01), калия фосфат двузамещенный (ФС 42-1297-79), натрия фторид (ФС.2.2.0013.15), вспомогательные вещества – гелеобразователь натрий-карбоксиметилцеллюлозу (натрий-КМЦ) C75 (ТУ 6-55-39-90), пластификатор глицерин (ФС.2.2.0006.15), воду очищенную (ФС.2.2.0020.15).

Исследование remineralizing активности проводили методом определения кальция и фосфора в золе эмали *in vitro* со статистической обработкой полученных результатов согласно ОФС.1.1.0013.15

с использованием критического значения критерия Стьюдента и методом электрометрического исследования путем определения электропроводности эмали *in vivo*.

Проведение данных исследований соответствовало этическим стандартам ответственного комитета по экспериментам человека (институциональным и национальным) и Хельсинской декларации 1975 г., пересмотренной в 2000 году. Исследования одобрены Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России.

На основе информированного добровольного согласия в исследование по определению кальция и фосфора в золе эмали *in vitro* включены визуально интактные зубы (моляры и премоляры нижней челюсти), удаленные по ортодонтическим и ортопедическим показаниям у лиц 20–35 лет. Удаленные зубы хранили в термостате при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ в растворе искусственной слюны [13]. Для проведения исследований опытные образцы были разделены на 2 группы (по 10 опытных образцов в каждой группе): 1 – гель для лечения кариеса эмали, 2 – пленки лекарственные для лечения кариеса эмали.

Каждый зуб предварительно очищали с использованием щетки и пасты, не содержащей фтора, и изготавливали полушлифы с помощью специального оборудования, одна половина зуба служила контролем и не поддавалась лечению, вторая половина зуба подвергалась полному курсу лечения. Ежедневно в течение 14 дней один раз в день проводили 15 минутные аппликации путем нанесения геля или фиксации пленок лекарственных на поверхность зубной эмали опытных образцов, при постоянной температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, в перерывах между лечением зубы находились в термостате в растворе искусственной слюны.

Метод определения кальция и фосфора в золе эмали *in vitro* основан на озолении зуба и последующим определением в нем кальция и фосфора химическими и инструментальными методами [14]. Исследуемые образцы озоляли отдельно друг о друга при температуре $450\text{--}500^\circ\text{C}$ в муфельной печи. Полученную золу использовали для определения кальция и фосфора. Количественное определение кальция проводили методом обратного комплексонометрического титрования [15, 16].

Методика: около 10,00 мг (точная навеска) золы растворяют в 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, после полного растворения золы добавляют 10 мл воды очищенной и 5 мл 0,05 М раствора натрия эдетата, перемешивают и добавляют аммиачный буферный раствор при перемешивании до $\text{pH}=12,5$, для исключения определения сопутствующих ионов магния. Индикатором служил кислотно-хромовый темно-синий. Избыток 0,05 М раствора натрия эдетата оттитровывают 0,1 М раствором магния сульфата. Параллельно проводят контрольный опыт. Аналитическим сигналом являлся переход окраски от синей до красно-фиолетовой. Расчет процентного содержания кальция вели по формуле:

$$C = \frac{T \cdot (V_1 - V_2) \cdot K \cdot 100}{a}, \text{ где}$$

C – количество кальция в % на 10 мг золы;

T – титр кальция по натрия эдетату, г/мл;

V_1/V_2 – количество мл титрованного раствора, пошедшего на титрование контрольной/опытной пробы, мл;

K – коэффициент поправки к молярности титрованного раствора;

100 – фактор пересчета в %;

a – исследуемая навеска золы, г.

Количественное определение фосфора проводили методом фотоэлектроколориметрии, для получения окрашенного раствора использовали реакцию молибденовой сини (сернокислый раствор молибдата натрия в водном растворе гидразина сульфата) [14].

Методика: около 10,00 мг (точная навеска) золы растворяют в 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и количественно разводят в мерной колбе вместимостью 250 мл. К 1 мл раствора золы добавляют смесь натрия молибдата в серной кислоте раствора 0,25% и гидразина сульфата водного раствора 0,15% в соотношении 2,5:1, перемешивают и выдерживают на кипящей водяной бане в течении 10 минут и определяют оптическую плотность при длине волны 650 нм против холостого контроля. Аналогично проводят исследование с 0,001% стандартным раствором фосфора. Расчет процентного содержания фосфора ведут по формуле:

$$C = \frac{A \cdot 0,01 \cdot 250 \cdot 100}{A_{\text{ст}} \cdot 10}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность исследуемого раствора;

$A_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартного раствора;

0,01 – содержание фосфора в мг в 1 мл стандарта;

10 – количество мг золы в исследуемой навеске;

250 – объем, в котором растворена навеска;

100 – фактор пересчета в %;

C – количество фосфора в % на 100 г золы.

Электрометрическое исследование пленок лекарственных. На основе добровольного информированного согласия в исследовании принимали участие 45 пациентов с установленным диагнозом кариес эмали, из которых 30 пациентов находилось в возрасте 18–25 лет и 15 в возрасте от 7 до 16 лет. В целом, лечению подверглось 78 зубов фронтальной группы. Оценка клинических данных проводилась на основании индексной оценки состояния гигиены полости рта, интенсивности кариеса (КПУ), электропроводности эмали и витального окрашивания эмали 2% раствором метиленового синего (интенсивность окрашивания очагов деминерализации эмали определяли по контрольной градационной десятипольной полутоновой шкале) [17].

Уровень гигиены полости рта всех пациентов при первичном обследовании соответствовал критериям «хороший» и «удовлетворительный». Пациенты предъявляли жалобы на наличие белого пятна (косметический дефект) и чувство оскомины, также отмечалась повышенная проницаемость эмали при ее витальном окрашивании.

По итогам исходного осмотра всем пациентам проведена процедура профессиональной гигиены полости рта, также пациенты прошли обучение правилам гигиенического ухода за полостью рта и методике самостоятельного использования пленок лекарственных в амбулаторных условиях. Рекомендовались аппликации пленок лекарственных на вестибулярную поверхность зубов в области очага деминерализации (кратность применения – 1 раз в день, на ночь). Курс реминерализующей терапии с использованием аппликаций пленок лекарственных составлял 1 месяц и более в зависимости от выра-

женности клинических проявлений. Все пациенты находились на диспансерном наблюдении до 1 года. Контроль электропроводности эмали (ЭПЭ) осуществляли с помощью аппарата «Дентэст» (Гео-софт).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследование реминерализующей активности проводили методом определения кальция и фосфора в золе эмали со статистической обработкой полученных результатов согласно ГФ РФ XIII издания [18]. Результаты исследования реминерализующей активности методом *in vitro* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание кальция и фосфора (%) в золе эмали до и после лечения гелем и пленками лекарственными для лечения кариеса эмали

Препарат	Содержание кальция в золе, %		Содержание фосфора в золе, %	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Гель	37,39±2,17	38,21±2,72	23,88±0,78	24,70±0,45
	36,57±1,32	40,67±3,14	25,92±0,96	27,25±0,62
	32,81±1,54	36,08±1,11	24,77±0,64	26,90±1,37
	34,42±1,53	37,25±2,07	26,05±0,89	27,48±0,96
	36,17±2,23	39,02±2,52	25,59±0,37	27,13±1,05
Пленки лекарственные	36,57±0,98	39,03±1,56	29,12±1,06	29,45±0,39
	38,21±2,30	39,03±2,98	23,28±0,18	25,15±0,98
	31,16±1,62	39,6±2,45	26,38±0,71	26,68±0,59
	35,12±1,44	38,06±1,17	25,68±0,67	26,72±0,41
	37,39±2,01	38,21±2,27	23,88±0,65	24,70±0,54

На основании данных, представленных в таблице 1, установлено, что разработанные лекарственные формы для лечения кариеса эмали достоверно повышают содержание кальция и фосфора в эмали зуба. Гель и пленки лекарственные проявляют сопоставимую друг с другом реминерализующую активность, достоверно превышающую контрольные показатели, и могут быть взаимозаменяемы при применении по усмотрению лечащего врача.

Электрометрическое исследование. Предварительный осмотр пациентов выявил наличие на вестибулярной поверхности зубов фронтальной группы очаговую деминерализацию эмали (ОДЭ) с различной интенсивностью поражения. При зондировании установлено, что эмаль в области очагов деминерализации имела матовую и шероховатую поверхность. В 41,1% наблюдений очаги деминерализации эмали составили от 1,5 до 2 мм, средняя степень окрашивания от 4 до 5 баллов и средняя величина окрашивания – $4,6 \pm 0,21$ мм. В 58,9% случаях выявлены более крупные очаги деминерализации эмали размером от 3 до 4 мм (3 пациента имели ОДЭ более 4,5 мм). В этих случаях отмечена и более высокая степень окрашивания от 6 до 10 баллов со средней величиной окрашивания $7,9 \pm 0,18$ мм. Жалобы на повышенную чувствительность зубов в области ОДЭ на химические и температурные раздражители предъявляли 5 пациентов.

В результате курсового применения пленок лекарственных в течение 30 дней у всех пациентов отмечена тенденция к уменьшению интенсивности

поражения поверхностного слоя эмали. В 26,7% наблюдений (12 пациентов) окрашивание эмали отсутствовало, в 44,4% наблюдений (20 пациентов) выявлена низкая степень окрашивания, в 28,9% случаях (13 пациентов) отмечена средняя степень окрашивания. Значительно сократились размеры ОДЭ с 4,5 мм до 2,5–3 мм. Очаги деминерализации со степенью окрашивания 6 баллов и более не обнаружены. После прохождения курса лечения пациенты не предъявляли жалоб на повышенную чувствительность, также чувствительность эмали отсутствовала при зондировании очага деминерализации, что является важным критерием проявления реминерализующей активности пленок лекарственных. При дальнейшем применении пленок лекарственных наблюдалось уменьшение размеров очагов деминерализации и их полное исчезновение. Также у части пациентов исчезла матовость и шероховатость поверхности эмали в области очаговой деминерализации, поверхность стала гладкой и блестящей.

Электрометрические исследования свидетельствуют о том, что применение пленок лекарственных способствовало снижению электропроводности эмали и повысило степень минерализации эмали в 1,5–2 раза. При исходном обследовании области ОДЭ ЭПЭ составляла от 3,6 мкА до 2,5 мкА, а спустя 30 дней после лечения ЭПЭ снизилась до 1,7–1,5 мкА. При более продолжительном лечении очаговой деминерализации эмали ЭПЭ уменьшилась до 1,15–0,2 мкА.

Исходя из выше представленных результатов

проведенного электрометрического исследования, можно сделать заключение о благоприятном воздействии пленок лекарственных на эмаль зуба. В частности, реминерализующая эффективность пленок лекарственных подтвердилась повышением твердости структуры эмали, уменьшением интенсивности окрашивания пятен ОДЭ, снижением чувствительности зубов к раздражителям различной природы до ее полного исчезновения. Таким образом, разработанные пленки лекарственные можно рекомендовать к

использованию в качестве лечебно-профилактического средства, способствующего улучшению состояния твердых тканей зуба.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате проведенных исследований *in vivo* и *in vitro* установлено, что разработанные ЛФ оказывают реминерализующий эффект – насыщают зубную эмаль ионами кальция и фосфора, что позволяет рекомендовать гели и пленки лекарственные для повышения эффективности профилактики и лечения начального кариеса эмали.

INTRODUCTION. Nowadays, the problem of dental caries is a serious medical and social problem. In the structure of dental diseases, caries and its complications occupy 95.5%. Progressive lesion of hard tooth tissues, complicated by inflammation of the pulp and periapical tissues, causes acute pains, often leads to loss of teeth and can be a source of diseases of the musculoskeletal system and internal organs [1, 2]. One of the most promising areas of dental caries prophylaxis is remineralizing therapy aimed at normalizing the mineral composition of tooth enamel which consists of professional dentistry with special preparations. With the help of remineralizing therapy, it is possible to saturate enamel with ions of calcium and phosphorus, fluoride, etc., remove demineralized areas of tooth enamel caused by the process of demineralization, and also by the influence of preventive measures, prevent enamel damage caused by wash-out of mineral elements from hard tooth tissues [3–6]. As a result of the complex of scientific and experimental research carried out at the Department of Pharmaceutical Technology of Perm State Pharmaceutical Academy (PSPA), gel and drug films for the treatment of enamel caries have been developed [7–12].

THE AIM of this work is to study remineralizing activity of dosage forms for the treatment of initial enamel caries.

MATERIALS AND METHODS. As active pharmaceutical substances in dosage forms, calcium chloride (FS 42-0006-5675-04 P.003964.01), potassium phosphate disubstituted (FS 42-1297-79), sodium fluoride (PS.2.2.0013.15), auxiliary substances – gelling agent sodium-carboxymethylcellulose (sodium-CMC) C75 (TU 6-55-39-90), plasticizer glycerin (PS.2.2.0006.15), purified water (PS.2.2.0020.15) – have been used. Remineralizing activity was studied by the method of determination of calcium and phosphorus in the enamel ash *in vitro*. The statistical processing of the obtained results was performed according to GPA 1.1.0013.15 using the critical value of Student's t-test and the electrometric method, by determining the electrical conductivity of the tooth enamel *in vivo*.

These studies were carried out in accordance with the ethical standards of the committee responsible for human experiments (institutional and national) and the 1975 Helsinki Declaration, revised in 2000. The studies were approved by the Local Ethical Committee of FSAEI HE "Perm State Medical University" n.a. E.A. Vagner (the Ministry of Health of the Russian Federation").

On the basis of the informed voluntary consent, visually intact teeth (molars and premolars of the lower jaw), removed on orthodontic and orthopedic grounds in individuals aged 20–35, were included in the study of determination of calcium and phosphorus in the enamel ash *in vitro*. The removed teeth were stored in the thermostat at the temperature of $37 \pm 2^\circ\text{C}$ in the solution of artificial saliva [13]. For the study, the prototypes were divided into 2 groups (10 test samples in each group): 1 – drug gel for the treatment of enamel caries, 2 – drug films for the treatment of enamel caries.

Each tooth was pre-cleaned by brush and fluoride-free paste and half-sliced with the use of special equipment. One half of the tooth served as a test sample and was not subjected to treatment, the second half of the tooth was subjected to a full course of treatment. For 14 days, once every day, 15-minute applications were made by applying drug gel or fixing drug films to the surface of the enamel of the test samples at the constant temperature of $37 \pm 2^\circ\text{C}$. In the intervals, the teeth were in the thermostat in the solution of artificial saliva.

The method of determination of calcium and phosphorus in the enamel ash in vitro is based on tooth ashing and the subsequent determination of calcium and phosphorus in it by chemical and instrumental methods [14]. The test samples were ashed separately at $450\text{--}500^\circ\text{C}$ in the muffle furnace. The resulting ash was used to determine calcium and phosphorus in it.

Quantitative determination of calcium was carried out by reverse complexometric titration [15, 16].

Methods: about 10.00 mg (accurately weighed quantity) of ash is dissolved in 0.5 ml of concentrated hydrochloric acid; after complete dissolution of the ash, 10 ml of purified water and 5 ml of 0.05 M sodium edetate solution are added and mixed up, then the ammonia buffer solution is added while stirring up to $\text{pH} = 12.5$ to exclude the determination of concomitant magnesium ions. The indicator is an acid-chrome-tanned dark blue colour. The excess 0.05 M sodium edetate solution is titrated with 0.1 M magnesium sulfate solution.

At the same time, a control experiment is conducted. An analytical signal is a color transition from blue to red-violet. The calculation of the percentage of calcium is carried out according to the formula:

$$C = \frac{T \cdot (V_1 - V_2) \cdot K \cdot 100}{a}, \text{ where}$$

C – the quantity of calcium per 10 mg of ash, %;

T – the titer of calcium for sodium edetate, g / ml;

V_1 / V_2 – the number of ml of the titrated solution used for the titration of the control / test sample, ml;

K – a correction coefficient to the molarity of the titrated solution;

100 – a conversion factor, %;

a – a weighed quantity of ash, g.

Quantitative determination of phosphorus was carried out by photoelectrocolorimetry. To obtain a colored solution, a molybdenum blue reaction (sodium molybdate sulphate solution in hydrazine sulfate aqueous solution) was used [14].

Methods: about 10.00 mg (accurately weighed quantity) of ash is dissolved in 0.5 ml of concentrated hydrochloric acid and quantitatively diluted in a volumetric flask with a capacity of 250 ml. A mixture of sodium molybdate in 0.25% sulfuric acid solution and hydrazine – 0.15% sulphate aqueous solution – in the ratio of 2.5:1 is added to 1 ml of the ash solution; the ingredients are mixed up and kept in a boiling water bath for 10 minutes. The optical density is determined at the wavelength of 650 nm against blank monitoring. Similarly, a study is carried out with 1 mg of a standard phosphorus solution. The percentage of phosphorus is calculated according to the formula:

Similarly, a study is carried out with 0.001% standard phosphorus solution.

$$C = \frac{A * 0.01 * 250 * 100}{A_{st} * 10}, \text{ where}$$

A – the optical density of the test solution;

A_{st} – the optical density of the standard solution;

0.01 – the quantity of phosphorus in 1 ml of the standard, mg;

10 – the quantity of ash in the test sample, mg;

250 – the volume in which the sample is dissolved;

100 – a conversion factor, %;

C – the quantity of phosphorus per 100 g of ash, %.

Electrometric study of drug films. On the basis of the informed voluntary consent, 45 patients with the estab-

lished caries enamel diagnosis participated in the study, hereby 30 patients were aged 18–25 and 15 patients were aged from 7 to 16. In total, 78 teeth of the frontal group were treated. The clinical data were evaluated on the basis of the index assessment of the oral hygiene state, def caries index, the electrical enamel conductivity of and vital staining of enamel with a 2% solution of methylene blue (the intensity of staining of the enamel demineralization foci was determined on the basis of the control gradation tenfold grayscale scale) [17].

In the primary examination the level of oral hygiene of all the patients met the criteria of “good” and “satisfactory”. The patients complained about the presence of a white spot as a cosmetic defect and a sense of numbness, and there was also an increased permeability of the enamel in response to its vital staining.

Based on the results of the initial examination, all the patients were subjected to the professional oral hygiene procedure, and the patients were trained in hygienic care of the oral cavity and the methods of the self-use use of drug films in outpatient settings. Drug films were recommended to apply to the vestibular surface of the teeth in the area of the demineralization focus (the frequency of application was once a day, before going to bed). The course of remineralizing therapy with the use of drug films applications was 1 month or longer, depending on the severity of clinical manifestations. All the patients were on dispensary supervision for up to a year. The enamel electrical conductivity of the enamel (EEC) was monitored with the help of the Dentest device (Geosoft).

RESULTS AND DISCUSSION. The study of remineralizing activity was carried out by the method of determination of calcium and phosphorus in the ash of enamel with statistical processing of the results obtained according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII-th edition [18]. The results of the study of remineralizing activity by the *in vitro* method are presented in Table 1.

Table 1 – Calcium and phosphorus content (%) in the enamel ash before and after the treatment of enamel caries with gel and drug films

Study medication	Calcium content in the enamel ash, %		Phosphorus content in the enamel ash, %	
	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
Gel	37.39±2.17	38.21±2.72	23.88±0.78	24.70±0.45
	36.57±1.32	40.67±3.14	25.92±0.96	27.25±0.62
	32.81±1.54	36.08±1.11	24.77±0.64	26.90±1.37
	34.42±1.53	37.25±2.07	26.05±0.89	27.48±0.96
	36.17±2.23	39.02±2.52	25.59±0.37	27.13±1.05
Drug films	36.57±0.98	39.03±1.56	29.12±1.06	29.45±0.39
	38.21±2.30	39.03±2.98	23.28±0.18	25.15±0.98
	31.16±1.62	39.6±2.45	26.38±0.71	26.68±0.59
	35.12±1.44	38.06±1.17	25.68±0.67	26.72±0.41
	37.39±2.01	38.21±2.27	23.88±0.65	24.70±0.54

Basing on the data presented in Table 1, it has been established that the developed dosage forms for the treatment of enamel caries significantly increase the content

of calcium and phosphorus in the tooth enamel. The gel and drug films show the remineralizing activity comparable to each other that significantly exceed the control

indices and can be used interchangeably when applied at the discretion of the attending physician.

Electrometric study. A preliminary examination of the patients revealed the presence of focal enamel demineralization with different intensity of lesion on the vestibular surface of the teeth of the frontal group. While probing it was established that the enamel in the area of the foci of demineralization had a matte and rough surface. In 41.1% of cases, the enamel demineralization foci were from 1.5 to 2 mm, the average degree of staining was from 4 to 5 points, and the average staining value was 4.6 ± 0.21 mm. In 58.9% of cases, larger enamel demineralization foci with the size from 3 to 4 mm were detected (3 patients had the area of focal enamel demineralization larger than 4.5 mm).

As a result of the course use of drug films for 30 days, all the patients showed a tendency to reduce the intensity of the lesion of the surface enamel layer. In 26.7% of cases (12 patients), enamel staining was absent, 44.4% of observations (20 patients) showed a low degree of staining, in 28.9% of cases (13 patients), an average degree of staining was noted. The sizes of the focal enamel demineralization significantly reduced from 4.5 mm to 2.5–3 mm. The foci of demineralization with a degree of staining of 6 points or more were not found out. After the course of treatment, the patients did not complain of the increased sensitivity, and the sensitivity of the enamel was absent when probing the focus of demineralization, being an important criterion for demonstrating the remineralizing activity of drug films. With further application of the drug films, a decrease in the dimensions of the demineralization foci and their complete disappearance

was observed. Besides, a number of patients stopped suffering from dullness and roughness of the enamel surface in the area of focal demineralization; the surface has become smooth and shiny.

Electrometric studies indicate that the use of drug films contributed to the decrease in the electrical conductivity of enamel and increased the degree of enamel mineralization by the factor of 1.5–2. At the initial survey of the focal enamel demineralization, the electrical enamel conductivity (EEC) was from 3.6 μ A to 2.5 μ A, and 30 days after treatment the EEC decreased to 1.7–1.5 μ A. With a more prolonged treatment of the enamel focal demineralization, the EEC decreased to 1.15–0.2 μ A.

Basing on the results of the electrometric study presented above, it is possible to draw a conclusion about the favorable effect of drug films on tooth enamel. In particular, the remineralizing efficiency of the drug films was confirmed by the increase in the hardness of the enamel structure, a decrease in the staining intensity of the focal enamel demineralization spots, a decrease in the sensitivity of the teeth to stimuli of various nature, until its complete disappearance. Thus, the developed drug films can be recommended to be used as a therapeutic and prophylactic agent that contributes to the improvement of the condition of hard tooth tissues.

CONCLUSION. As a result of the studies conducted in vivo and in vitro, it has been established that saturating the tooth enamel with calcium and phosphorus ions, the developed dosage forms have a remineralizing effect and, therefore, can be recommended for increasing the effectiveness of prevention and treatment of the initial enamel caries.

Библиографический список

1. Зайцев А.Н. Распространенность кариеса зубов // Сибирский медицинский журнал. 2004. №6. С. 86–88.
2. Cochrane N.J., Cai F., Hug N.L., Burrow M.F., Reynolds E.C. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel // Journal of Dental Research. 2010. Vol. 89 (11). P. 1187–1197.
3. Барковский Е.В., Бувиловский А.В., Кармалькова И.С. Химические основы деминерализации и реминерализации эмали зубов // Вестник ВГМУ. 2011. №1 (10). С. 143.
4. Федоров Ю.А., Дрожжина В.А., Матело С.К., Туманова С.А. Клинические возможности применения современных реминерализующих составов у взрослых // Клиническая стоматология. 2008. №3 (47). С. 32–34.
5. Eric C. Reynolds Calcium phosphate-based remineralization systems: Scientific evidence? // Australian Dental Journal. 2008. Vol. 53. Is. 268. P. 73. URL: https://www.researchgate.net/publication/23248073_Calcium_phosphate-based_remineralization_systems_Scientific_evidence (дата обращения: 01.10.2017)
6. Fontana M., Walsh L.J., Amaechi B.T., Ngo H.C. Aids to remineralization. In Graham J. Mount, Wyatt R. Hume, Hien C. Ngo and Mark S. Wolff (Ed.), Preservation and restoration of tooth structure Third edition ed. Chichester, West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons. 2016. P. 67–80.
7. Голованенко А.Л., Березина Е.С., Третьякова Е.В., Першина Р.Г. Стандартизация пленок для лечения кариеса эмали // Фундаментальные исследования. 2014. № 9 (5). С. 1038–1041.
8. Рюмина Т.Е., Голованенко А.Л., Третьякова Е.В., Березина Е.С. Биофармацевтические исследования геля и пленок лекарственных для лечения кариеса эмали // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 4. URL: <http://www.science-education.ru/127-20690> (дата обращения: 22.07.2015).
9. Голованенко А.Л., Березина Е.С., Третьякова Е.В., Алексеева И.В. Стандартизация геля для реминерализации эмали // Химико-фармацевтический журнал. 2015. № 12 (49). С. 47–50.
10. Третьякова Е.В., Березина Е.С., Голованенко А.Л., Алексеева И.В. Валидация методик количественного определения компонентов в пленках лекарственных для лечения кариеса эмали // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1. URL: <http://www.science-education.ru/121-19155> (дата обращения: 19.05.2015).
11. Голованенко А.Л., Третьякова Е.В., Березина Е.С., Алексеева И.В. Современный подход к разработке лекарственных форм для проведения реминерализующей терапии // Медицинский альманах. 2017. № 2 (47). С. 141–145.

12. Третьякова Е.В., Махмудов Р.Р., Голованенко А.Л. Исследование острой токсичности гелей и пленок лекарственных для лечения кариеса эмали и дентина // Биофармацевтический журнал. 2017. № 2 (9). С. 59–61.
13. Булкина Н.В., Пудовкина Е.А., Захаревич А.М. Ультрамикроскопическое исследование процессов деминерализации и реминерализации эмали // Стоматология. 2012. № 3. С. 11–14.
14. Леонтьев В.К., Петрович Ю.А. Биохимические методы исследования в клинической и экспериментальной стоматологии. Омск, 1976. 89 с.
15. Боровский Е.В., Максимовская Л.Н. Содержание кальция, фосфора и фтора в поверхностном слое эмали при кариесе и сходных с ним поражениях зубов // Стоматология. 1982. № 3. С. 32–34.
16. Петрухина О.М. Аналитическая химия. Химические методы анализа. М.: Химия, 1992. 400 с.
17. Леонтьев В.К., Иванова Г.Г., Жорова Т.Н. Электрометрическая диагностика поражений твердых тканей зубов // Стоматология. 1990. №5. С. 19–24.
18. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание. 2015. Том 1. 1470 с.

References

1. Zaytsev AN. Rasprostranennost kariesa zubov [Prevalence of dental caries]. Siberian Medical Journal. 2004;6:86–8. Russian.
2. Cochrane NJ, Cai F, Hug NL, Burrow MF, Reynolds EC. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. Journal of Dental Research. 2010;89(11):1187–97.
3. Barkovskiy EV, Buvilovskiy AV, Karmalkova IS. Himicheskie osnovy demineralizatsii i remineralizatsii email zubov [Chemical basis of demineralization and remineralization of tooth enamel]. Vestnik VGMU 2011;1(10):143. Russian.
4. Fedorov YUA, Drojjina VA, Matelo SK, Tumanova SA. Klinicheskie vozmojnosti primeneniya sovremennykh remineralizuyushchih sostavov u vzroslykh [Clinical possibilities of application of modern remineralizing compositions in adults]. Clinical stomatology. 2008;3(47):32–4. Russian.
5. Eric C Reynolds. Calcium phosphate-based remineralization systems: Scientific evidence? Australian Dental Journal. [Internet] 2008 [cited 2017 Nov 01]. 53(3):268–73. Available from: https://www.researchgate.net/publication/23248073_Calcium_phosphate-based_remineralization_systems_Scientific_evidence.
6. Fontana M, Walsh LJ, Amaechi BT, Ngo HC. Aids to remineralization. In Graham J. Mount, Wyatt R. Hume, Hien C. Ngo, Mark S. Wolff, editors. Preservation and restoration of tooth structure Third edition ed. 2016:67–80. Chichester, West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons.
7. Golovanenko AL, Berezina ES, Tretyakova EV, Pershina RG. Standartizatsiya plenok dlya lecheniya kariesa email [Standardization of films for the treatment of enamel caries]. Fundamental research. 2014;9(5):1038–41. Russian.
8. Ryumina TE, Golovanenko AL, Tretyakova EV, Berezina ES. Biofarmatsevticheskie issledovaniya gelya i plenok lekarstvennykh dlya lecheniya kariesa email [Biopharmaceutical studies of gel and drug films for the treatment of enamel caries]. Modern problems of science and education. [Internet]. 2015;4. [cited 2015 Jul 22]. Available from: <http://www.science-education.ru/127-20690> Russian.
9. Golovanenko AL, Berezina ES, Tretyakova EV, Alekseeva IV. Standartizatsiya gelya dlya remineralizatsii emali [Standardization of gel for remineralization of enamel]. Chemical and Pharmaceutical Journal. 2015;12(49):47–50. Russian.
10. Tretyakova EV, Berezina ES, Golovanenko AL, Alekseeva IV. Validatsiya metodik kolichestvennogo opredeleniya komponentov v plenakh lekarstvennykh dlya lecheniya kariesa email [Validation of the methods of quantitative determination of components in drug films for the treatment of enamel caries]. Modern problems of science and education. [Internet]. 2015;1. [cited 2015 May 19]. Available from: <http://www.science-education.ru/121-19155> Russian.
11. Golovanenko AL, Tretyakova EV, Berezina ES, Alekseeva IV. Sovremennyy podhod k razrabotke lekarstvennykh form dlya provedeniya remineralizuyushchey terapii [Modern approach to the development of medicinal forms for remineralizing therapy]. Medical Almanac. 2017;2(47):141–5. Russian.
12. Tretyakova EV, Mahmudov RR, Golovanenko AL. Issledovanie ostroy toksichnosti geley i plenok lekarstvennykh dlya lecheniya kariesa emali i dentina [A study of the acute toxicity of gels and drug films for the treatment of enamel and dentin caries]. Biopharmaceutical Journal. 2017;2(9):59–61. Russian.
13. Bulkina NV, Pudovkina EA, Zaharevich AM. Ultramikroskopicheskoe issledovanie protsessov demineralizatsii i remineralizatsii email [Ultramicroscopic study of the processes of demineralization and remineralization of enamel]. Stomatologiya. 2012;3:11–4. Russian.
14. Leontev VK, Petrovich YUA. Biohimicheskie metody i issledovaniya v klinicheskoy i eksperimentalnoy stomatologii [Biochemical methods of research in clinical and experimental dentistry]. Omsk;1976. 89 p.
15. Bоровский ЕВ, Максимовская ЛН. Сoderjaniekaltsiya, fosfora i flora v poverhnostnom sloe email pri kariese i shodnykh s nimporajeniyahzubov [The content of calcium, phosphorus and fluorine in the surface layer of the enamel in caries and similar dental lesions]. Stomatologiya. 1982;3:32–4. Russian.
16. Analiticheskaya himiya. Himicheskie metody ianaliza [Analytical chemistry. Chemical methods of analysis]. Petruhin OM, editor. Moscow: Himiya;1992. 400 p. Russian.
17. Leontev VK, Ivanova GG, Jorova TN. Elektrometricheskaya diagnostika porajeniy tverdyykh tkaney zubov [Electrometric diagnostics of lesions of hard tissues of teeth]. Stomatologiya. 1990;5:19–24. Russian.
18. Gosudarstvennaya Farmakopeya RF [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIII edition. 2015;1:1470. Russian.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы

Голованенко Анна Леонидовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» МЗ РФ. Область научных интересов: теоретическое и экспериментальное обоснование создания лекарственных препаратов реминерализующего действия для профилактики и лечения кариеса. E-mail: annagolovanenko@yandex.ru.

Третьякова Екатерина Владимировна – ассистент кафедры фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» МЗ. Область научных интересов: разработка составов, технологии и стандартизация лекарственных форм для лечения кариеса эмали. РФ. E-mail: tiloket@mail.ru.

Патлусова Елена Сергеевна – заведующая патологоанатомического отделения государственного бюджетного учреждения здравоохранения Пермского края «Краевой детской клинической больницы». Область научных интересов: проведение гистологических и морфометрических исследований лекарственных препаратов многофакторного действия, применяющихся в стоматологии. E-mail: info@permkdkb.ru

Алексеева Ирина Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» МЗ РФ. Область научных интересов: комплексные исследования по созданию лекарственных форм для лечения раневых и воспалительных процессов на основе местноанестезирующего средства – анилокаина. E-mail: alekseeva@pfa.ru.

Березина Елена Станиславовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии ФДПО и ФЗО, ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» МЗ РФ. Область научных интересов: разработка, модификация и апробация методик испытания на подлинность и количественного определения лекарственных средств в лекарственных препаратах для профилактики и лечения кариеса. E-mail: berezina@pfa.ru.

Першина Роза Галимзяновна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии факультета ДПО ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет» им. академика Е.А. Вагнера. Область научных интересов: клинико-лабораторные исследования реминерализующей эффективности лекарственных препаратов для профилактики и лечения кариеса. E-mail: stomatpsma@gmail.com

Authors

Golovanenko Anna Leonidovna – PhD (Pharmacy), docent of the Department of Pharmaceutical Technology of FSAEI HE “Perm State Pharmaceutical Academy”. Research interests: theoretical and experimental justification for the creation of remineralizing drugs for the prevention and treatment of caries. E-mail: annagolovanenko@yandex.ru

Tret'yakova Ekaterina Vladimirovna – assistant student of the Department of Pharmaceutical Technology of FSAEI HE “Perm State Pharmaceutical Academy”. Research interests: formulation, technology and standardization of dosage forms for the treatment of enamel caries. E-mail: tiloket@mail.ru.

Patlusova Elena Sergeevna – Head of the Department of Morbid Anatomy, State budgetary health care institution of the Perm region “Regional Children’s Clinical Hospital”. Research interests: carrying out histological and morphometric studies of multifactorial drugs used in dentistry. E-mail: info@permkdkb.ru

Alekseeva Irina Vladimirovna – PhD (Pharmacy), Professor of the Department of Pharmaceutical Technology of FSAEI HE “Perm State Pharmaceutical Academy”. Research interests: comprehensive research on the development of medicinal forms for the treatment of wound and inflammatory processes based on local anesthetics – anilocaine. E-mail: alekseeva@pfa.ru.

Berezina Elena Stanislavovna – PhD (Pharmacy), docent of the Department of Pharmaceutical Chemistry (faculty of Additional Professional Education and Industrial Training), FSAEI HE “Perm State Pharmaceutical Academy”. Research interests: development, modification and approbation of test methods for authenticity and quantitative determination of medicinal products in medicinal preparations for prevention and treatment of caries. E-mail: berezina@pfa.ru.

Pershina Roza Galimzyanovna – PhD (Medicine), docent of the Department of Dentistry, faculty of FVE (further vocational education) of FSAEI HE “Perm State Medical University” n.a. E.A. Vagner. Research interests: clinical and laboratory studies of the remineralizing effectiveness of drugs for the prevention and treatment of caries. E-mail: stomatpsma@gmail.com

Поступила в редакцию: 21.05.2018
Отправлена на доработку: 21.06.2018
Принята к печати: 16.07.2018

Received: 21.05.2018
Sent back for revision: 21.06.2018
Accepted for publication: 16.07.2018