

VPLIV PROPILEN GLIKOLA NA PERMEACIJO DIKLOFENAKA IZ MAGISTRALNIH PRIPRAVKOV: *IN VITRO* ŠTUDIJA NA STRAT-M® MEMBRANI

FILIP DUGONIK^{1,‡}, URŠKA JERŠIČ^{1,‡*}, LEJLA KAČ^{1,‡},
LIDIJA GRADIŠNIK¹, TANJA ZIDARIČ¹ IN TINA MAVER^{1,2}

Sprejeto

31. 3. 2026

Recenzirano

27. 7. 2026

Izdano

14. 8. 2026

¹ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinske vede, Maribor, Slovenija (filip.dugonik@student.um.si, urska.jersic@student.um.si, lejla.kac@student.um.si, lidiya.gradisnik@um.si, tanja.zidaric@um.si)

² Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Katedra za farmakologijo, Maribor, Slovenija (tina.maver@um.si)

DOPISNA AVTORICA

tina.maver@um.si

Povzetek Namen raziskave je bil ovrednotiti vpliv propilen glikola kot pospeševalca permeacije na prehajanje natrijevega diklofenaka iz dveh magistralnih formulacij skozi sintetično membrano Strat-M® v *in vitro* pogojih. Preučevani sta bili formulaciji na osnovi PentraVan® brez pospeševalca in s 24 % (m/m) propilen glikola. Permeacija je bila določena z uporabo Franzovih difuzijskih celic in UV-Vis spektrofotometrije. Formulacija z dodanim propilen glikolom je izkazovala višje koncentracije diklofenaka, večjo kumulativno permeacijo in večji delež permeirane učinkovine. Razlike so bile izrazitejše pri daljših časih. Rezultati potrjujejo, da propilen glikol izboljša permeacijo diklofenaka in poudarjajo pomen formulacijskih dejavnikov pri razvoju topičnih pripravkov.

‡ Avtorji so enakovredno doprinesli k raziskavi in si prvo avtorstvo delijo.

Ključne besede:

diklofenak,

in

vitro

permeacija,

Strat-M®

membrana,

propilen

glikol,

magistralni

preparati.



EFFECT OF PROPYLENE GLYCOL ON DICLOFENAC PERMEATION FROM COMPOUNDED PREPARATIONS: AN *IN VITRO* STRAT-M® MEMBRANE STUDY

FILIP DUGONIK^{1,‡}, URŠKA JERŠIČ^{1,‡*}, LEJLA KAČ^{1,‡},
LIDIJA GRADIŠNIK¹, TANJA ZIDARIČ¹ AND TINA
MAVER^{1,2}

Accepted

31. 3. 2026

Revised

27. 7. 2026

Published

14. 8. 2026

¹ University of Maribor, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences,
Maribor, Slovenia (filip.dugonik@student.um.si, urska.jersic@student.um.si,
lejla.kac@student.um.si, lidiya.gradisnik@um.si, tanja.zidacic@um.si).

² University of Maribor, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Maribor,
Slovenia (tina.maver@um.si).

CORRESPONDING AUTHOR

tina.maver@um.si

Abstract The aim of the study was to evaluate the effect of propylene glycol as a permeation enhancer on the permeation of diclofenac sodium from two compounded formulations through a Strat-M® synthetic membrane under *in vitro* conditions. Two Pentravan®-based formulations were investigated: one without enhancer and one containing 24% (w/w) propylene glycol. Permeation was assessed using Franz diffusion cells and UV-Vis spectrophotometry. The formulation containing propylene glycol showed higher diclofenac concentrations, greater cumulative permeation, and a higher fraction of permeated drug. Differences became more pronounced over time. The results confirm that propylene glycol enhances diclofenac permeation and highlight the importance of rational formulation design in topical preparations.

Keywords:

diclofenac
sodium,
in
vitro
permeation,
Strat-M®
membrane,
propylene
glycol,
compounded
preparations.

‡ The authors contributed equally to this work and share joint first authorship.

1 Uvod

Koža je dinamičen, večplasten organ, ki predstavlja primarno oviro med telesom in zunanjim okoljem ter ključno pregrado za lokalno aplicirane in transdermalno dostavljene učinkovine (Niehues idr., 2018). Njena kompleksna zgradba, sestavljena iz epidermisa, dermisa in hipodermisa, omogoča termoregulacijo, senzorično zaznavanje ter deluje kot fizikalna, kemična in imunološka bariera, ki natančno uravnava prehod ksenobiotikov (Lopez-Ojeda idr., 2025).

Epidermis, kot najbolj zunanja, 18 - 600 μm debela avaskularna plast, predstavlja primarni vmesnik z okoljem in ščiti pred dehidracijo ter zunanjimi mehanskimi, kemičnimi ter mikrobnimi vplivi (Meng idr., 2022; Niehues idr., 2018; Shuster idr., 1975). Sestavljen je pretežno iz keratinocitov, ki med svojo terminalno diferenciacijo tvorijo večplastni epitelij in se preoblikujejo v korneocite; sploščene, anukleirane celice, vgrajene v visoko organizirano medcelično lipidno matriko (Hofmann idr., 2023). Za primarno barierno funkcijo kože je odgovoren stratum corneum, tanek povrhnji sloj epidermisa (10–20 μm), ki deluje kot ključna pregrada za prehajanje snovi (Footner idr., 2023; Hofmann idr., 2023; Menon idr., 2012).

Dermis je 500 - 6000 μm debela plast, ki leži pod epidermisom in koži zagotavlja mehansko oporo, elastičnost in odpornost (Honari idr., 2017; Lee idr., 2024; Oltulu idr., 2018; Wong idr., 2016). Bogato je oživčen in vaskulariziran, njegovo zunajcelično matriko pa tvorijo pretežno fibroblasti, ki sintetizirajo kolagen, elastin in hialuronsko kislino (Hofmann idr., 2023).

Učinkovitost barierne funkcije epidermisa je odvisna od kompleksnega biokemijskega okolja. Ključno vlogo igra pH gradient – kislina površina kože (pH 4–6) zavira proteolitične encime in ščiti barierno integriteto. Lipidno matriko rožene plasti tvorijo ceramidi (skoraj polovica celotne mase), holesterol in nasičene proste maščobne kisline, ki se organizirajo v lamelarne strukture, selektivno prepustne za lipofilne spojine. Stopnjo hidracije uravnavajo akvaporin-3 in dermalna hialuronska kislina, ki vzdržujeta normalno transepidermalno izgubo vode ($4\text{--}10\text{ g h}^{-1}\text{ m}^{-2}$) (Boer idr., 2016).

Dermalna in transdermalna aplikacija zdravil predstavljata strategijo za dostavo učinkovin, pri kateri koža služi kot portal za lokalne ali sistemske terapevtske učinke (Brito idr., 2024; Zhao idr., 2024). Ključna prednost je obvod presnove prvega

prehoda v jetrih, s čimer se izboljša biološka uporabnost zdravila in zagotovi stabilen farmakokinetični profil (Brito idr., 2024; Jeong idr., 2021). Hkrati se zmanjša tveganje za sistemske neželene učinke, neinvazivnost aplikacije pa poveča sodelovanje bolnikov pri zdravljenju (Brito idr., 2024; Jeong idr., 2021).

Prehod učinkovin skozi kožo poteka po treh glavnih poteh: intercelularni (skozi lipidne intersticije rožene plasti), transcelularni (neposredno skozi korneocite) in transapendagealni (skozi lasne mešičke in žleze znojnice) (Brito idr., 2024; Zhao idr., 2024). Intercelularna pot je najpomembnejša za večino učinkovin, saj je njena površina zvezna in omogoča prehod lipofilnih ter relativno velikih molekul (Lee idr., 2024). Učinkovitost vsake poti je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti zdravila, stanja kože in lastnosti formulacije (Zhao idr., 2024).

Kljub prednostim je učinkovitost dermalne in transdermalne terapije omejena s pregradno funkcijo stratum corneum, ki preprečuje prehod molekul z večjo molekulsko maso ali neugodnimi fizikalno-kemičnimi lastnostmi (Brito idr., 2024). Za premagovanje teh ovir se uporabljajo kemični pospeševalci permeacije, nanonosilci ter aktivne fizikalne metode, kot so iontoforeza, sonoforeza in mikroigle (Jeong idr., 2021).

Nesteroidna protivnetna zdravila (NSAID) so prva izbira za zdravljenje akutne in kronične mišično-skeletne bolečine ter vnetja (Pradal, 2020). Njihovo delovanje temelji na zaviranju ciklooksigenaznih izooblik COX-1 in COX-2. Topična aplikacija omogoča doseganje terapevtskih koncentracij na mestu delovanja ob minimalni sistemske izpostavljenosti, kar je posebej primerno za starejše bolnike ter bolnike s pridruženimi kardiovaskularnimi, gastrointestinalnimi ali ledvičnimi boleznimi (Pennick idr., 2021; Pradal idr., 2019; Rannou idr., 2015). Klinične smernice zato vse pogosteje priporočajo topične NSAID kot terapijo prve izbire (Derry idr., 2015, 2016).

Natrijev diklofenak je med najpogosteje predpisanimi topičnimi NSAID. Njegova dovolj majhna molekulska masa (296 g/mol) omogoča difuzijo skozi roženo plast; vrednost pK_a 4,15 zagotavlja delno ionizacijo pri rahlo kislem pH kože, kar omogoča dobro topnost v formulaciji, visoka vrednost $\log P$ (4,51) pa lipofilnost, ki olajša penetracijo v globlje plasti kože (Pennick idr., 2021). V komercialnih formulacijah je diklofenak prisoten v obliki različnih soli (natrijev diklofenak,

diklofenak dietilamin, diklofenak epolamin), ki kažejo različno permeacijo skozi hidrofozne in hidrofilne membrane (Pradal, 2020).

Terapevtski učinek topičnih NSAID je v veliki meri odvisen od zasnove formulacije. Primerjalne *in vitro* študije so pokazale do desetkratne razlike v profilih permeacije med komercialnimi topičnimi NSAID, pripravljenimi v enakih eksperimentalnih pogojih (Milanowski idr., 2021). Emulgel z diklofenak dietilaminom je pokazal približno 4,4-krat večjo hitrost prehajanja kot hidrogel z natrijevim diklofenakom, pripisano ugodnejšim porazdelitvenim lastnostim soli in prisotnosti pospeševalcev permeacije (Milanowski idr., 2021). Pradal (2020) poroča, da se kumulativna absorpcija diklofenaka po 24 urah med komercialnimi pripravki razlikuje za več kot šestkrat (119–747 ng/cm²) kljub enaki koncentraciji učinkovine, kar potrjuje odločilno vlogo formulacijskih dejavnikov. Gelske formulacije običajno omogočajo hitrejšo sproščanje, emulzijske formulacije pa lahko kljub nižji koncentraciji dosežejo višjo absorpcijo (Manian idr., 2022; Pradal idr., 2019).

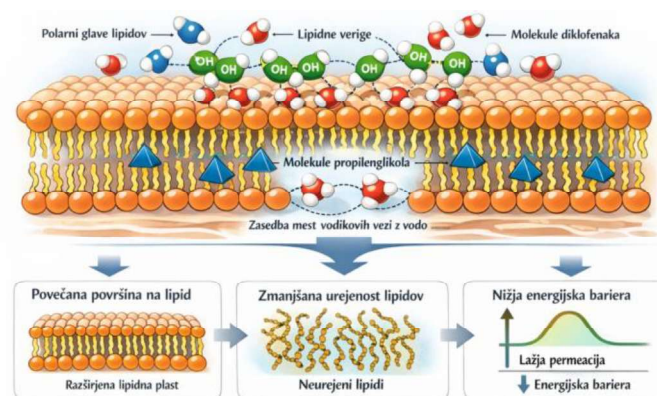
Formulacijsko pogojene razlike v permeaciji imajo pomemben klinični pomen tudi pri razvoju magistralnih in generičnih topičnih pripravkov. Dokazovanje terapevtske enakovrednosti namreč zahteva ne le kvantitativno in kvalitativno enakost sestave, temveč tudi primerljivo mikrostrukturo formulacije, saj ta ključno določa sproščanje zdravila, hitrost permeacije, porazdelitev v kožnih plasteh in končni terapevtski učinek (Manian idr., 2022). Magistralni pripravki so pri tem še posebej izpostavljeni, ker se pogosto pripravljajo z različnimi nosilci ali pomožnimi snovmi glede na razpoložljivost, kar lahko opazno vpliva na biofarmacevtske lastnosti pripravka kljub enaki koncentraciji učinkovine.

Izbira ustreznega nosilca je ključnega pomena pri razvoju učinkovitih topičnih pripravkov, saj določa fizikalno-kemijsko okolje ter s tem sproščanje in prehajanje zdravila skozi kožo (Kaushik idr., 2024). Lastnosti nosilca vplivajo na integriteto kožne bariere, stopnjo hidracije ter difuzijo učinkovin skozi roženo plast. Reološke lastnosti formulacije, zlasti viskoznost in viskoelastičnost, vplivajo na difuzijo zdravila, razmazljivost ter čas zadrževanja na koži (Manian idr., 2022).

Pospeševalci permeacije so pomožne snovi, ki izboljšujejo prehajanje zdravila skozi bariero rožene plasti z različnimi mehanizmi: motijo urejeno lipidno strukturo, povečajo topnost zdravila v formulaciji ali spremenijo porazdelitev zdravila med nosilcem in kožo (Wennberg idr., 2023). Med pogosto uporabljenimi pospeševalci

so organska topila, maščobne kisline, terpeni, glikoli in površinsko aktivne snovi (Patel idr., 2021; Pradal, 2020).

Propilen glikol je eden najpogostejše uporabljenih pospeševalcev permeacije v dermalnih formulacijah. Molekularne simulacije kažejo, da se lokalizira na meji polarnih glav lipidov v dvoslojih rožene plasti, zasede mesta vodikovih vezi z vodo in poveča površino na lipid (Slika 1), s čimer zmanjša urejenost lipidov in zniža energijsko bariero za permeacijo (Mistry in Notman, 2024). Primerjalne študije glikolov so podobno pokazale, da ti vplivajo na molekulsko gibljivost, strukturo in prepustnost rožene plasti (Kis idr., 2022).



Slika 1: Shematski prikaz predlaganega mehanizma delovanja propilen glikola kot pospeševalca permeacije v formulacijah diklofenaka.

Poleg tega deluje kot ko-solvent, ki povečuje topnost učinkovine in njeno termodinamsko aktivnost v formulaciji, kar povečuje gonilno silo za difuzijo (Carrer idr., 2020). Kombinacija teh dveh mehanizmov, motnje lipidne bariere in povečane termodinamske aktivnosti, pojasnjuje njegovo široko uporabo v topičnih formulacijah z diklofenakom.

Na podlagi predstavljenih izzivov je bil cilj naše raziskave ovrednotiti permeacijo natrijevega diklofenaka iz dveh magistralnih dermalnih formulacij z uporabo Strat-M® membrane v Franzovih difuzijskih celicah. Primerjali smo formulacijo Pentravan® z diklofenakom brez pospeševalca (F1) in z dodatkom 24 % (m/m) propilen glikola (F2), da bi neposredno ocenili vpliv te pomožne snovi na permeacijske lastnosti formulacije.

Prepoved testiranja dermalnih izdelkov na živalih v Evropski uniji ter etični pomisleki in fiziološke razlike med človeško in živalsko kožo povečujejo potrebo po alternativnih modelih (Derman idr., 2025). *In vitro* permeacijske študije so zato pomemben korak pred *in vivo* testiranjem, saj omogočajo oceno hitrosti in obsega permeacije iz topičnih formulacij ter zagotavljajo ponovljive in primerljive podatke (Nair idr., 2025).

Ex vivo človeška koža ostaja referenčni model, vendar njeno uporabo omejujejo dostopnost, etični vidiki in variabilnost med donorji (Bouwer idr., 2025). Med sintetičnimi membranami se je Strat-M® uveljavila kot zanesljiv nadomestni model: membrana je debela ~300 µm, sestavljena iz zgornje lipidno modificirane plasti in dveh poroznih plasti polietersulfona, ki skupaj posnemajo strukturne in kemijske lastnosti rožene plasti človeške kože (Bouwer idr., 2025; Nair idr., 2025). Primerjalne študije so pokazale korelacijski koeficient 0,99 med difuzijskimi parametri na Strat-M® in človeški koži ter faktor podobnosti 80–85 % (Kaur idr., 2018; Kichou idr., 2023); primerljivo prepustnost so potrdile tudi neposredne primerjave s človeško kadaversko kožo (Haq idr., 2018). Milanowski idr. (2021) so potrdili, da je Strat-M® primerna za optimizacijo metod za topične NSAID in za zanesljivo razlikovanje med formulacijami z različnimi permeacijskimi lastnostmi.

Permeacija učinkovin se najpogosteje vrednoti v vertikalnih Franzovih difuzijskih celicah, ki so standardni pristop pri študijah sproščanja in permeacije. Osnovo predstavljata donorski in receptorski predelek, ločena z membrano, skozi katero učinkovina difundira in je nato kvantificirana z ustrezno analitsko metodo (Bouwer idr., 2025; Nair idr., 2025).

2 Materiali in metode

2.1 Materiali

V raziskavi sta bili preučevani dve magistralni formulaciji diklofenaka, pripravljeni v Centralni lekarni Univerzitetnega kliničnega centra Maribor. Obe formulaciji sta temeljili na transdermalni osnovi Pentravan®. Kot učinkovina je bil uporabljen natrijev diklofenak (diclofenac sodium salt, Sigma-Aldrich, Nemčija). F1 je vsebovala 1 % (m/m) diklofenaka v Pentravan® podlagi. F2 je poleg 1 % (m/m) diklofenaka vsebovala 24 % (m/m) propilen glikola, preostanek (75 % m/m) pa je predstavljala Pentravan® podlaga.

Uporabljene so bile Strat-M® membrane (Merck Millipore Ltd., Irska) v obliki diskov, premera 25 mm (Trial Pack, ref. št. SKBM025TP), serija LOT 0000488378, shranjene in uporabljene v skladu z navodili proizvajalca. Receptorski medij je bil Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific), obogaten s 5 % (m/m) fetalnim govejim serumom (FBS, Thermo Fisher Scientific), 2 mmol/L L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicilina in 1 mg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich).

2.2 Metode

In vitro permeacijsko študijo smo izvedli z avtomatiziranim Franzovim difuzijskim celičnim sistemom Logan System 912-6 (Logan Instruments Corp., ZDA). Volumen receptorskega oddelka je znašal 15 mL, učinkovita difuzijska površina pa 3,14 cm². Receptorski medij je bil termostetiran na 32 °C (temperatura kožne površine) in kontinuirano mešan z magnetnim mešalom.

Strat-M® membrane so bile neposredno pred uporabo nameščene v Franzove difuzijske celice v skladu z navodili proizvajalca, pri čemer je bila svetleča stran obrnjena proti donorskemu predelku. Membrane pred uporabo niso bile dodatno obdelane.

Na površino membrane smo aplicirali določeno količino posamezne formulacije, za vsako v treh paralelkah. Za formulacijo F1 so začetne mase znašale 530 mg, 537 mg in 538 mg; za formulacijo F2 pa 531 mg, 527 mg in 536 mg. Različne mase nanosa so bile upoštevane pri izračunih koncentracij za posamezno časovno točko. Donorski predelek je bil po nanosu zaprt s parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje in zagotovili konstantne eksperimentalne pogoje.

Vzorec receptorskega medija (1 mL) je bil avtomatsko odvzet ob časovnih točkah: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 in 24 ur. Po vsakem odvzemu se je avtomatsko dodal svež medij za vzdrževanje konstantnega volumna receptorskega oddelka. Kumulativna količina permeirane učinkovine je bila izračunana z upoštevanjem standardne korekcije volumna pri zaporednem vzorčenju, ki upošteva razredčitev receptorske faze ob vsakem odvzemu in nadomestitvi.

Koncentracijo diklofenaka v vzorcih receptorske faze smo določali z UV-Vis spektrofotometrom Cary 60 (Agilent Technologies) pri valovni dolžini 289 nm, ki ustreza absorpcijskemu maksimumu natrijevega diklofenaka v receptorskem mediju, ugotovljenemu s skeniranjem spektra v območju 200–400 nm. Meritve smo izvajali

v kvarčnih kivetah z optično potjo 1 cm, pri čemer smo kot slepi vzorec uporabili čist receptorski medij. S tem smo odšteli morebitno lastno absorbanco komponent medija (DMEM/F-12 in FBS) pri merjeni valovni dolžini in zagotovili specifičnost metode. Kvantifikacija je temeljila na umeritveni krivulji, pripravljene z raztopinami diklofenaka v receptorskem mediju v koncentracijskem območju 0,001–0,040 mg/mL, pri čemer je bila vsaka koncentracija analizirana v treh ponovitvah.

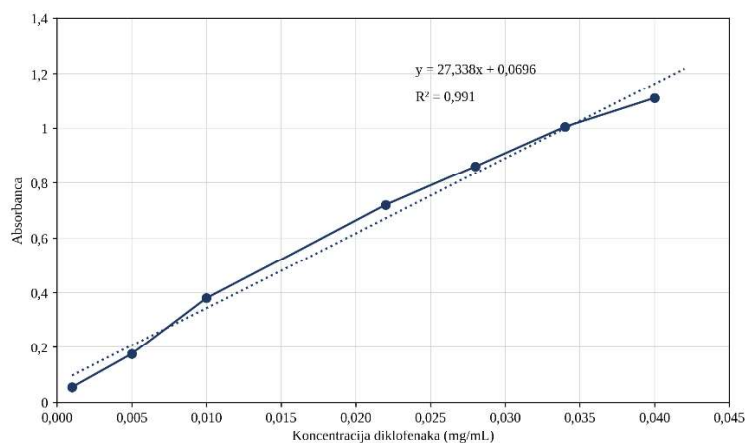
Vsak permeacijski poskus smo izvedli v treh paralelkah na formulacijo ($n = 3$). Rezultati so v besedilu in na grafih prikazani kot povprečje $\pm$ standardni odklon (SD). Zaradi majhnega števila ponovitev, inferenčnega statističnega testiranja razlik med formulacijama nismo izvajali. Vse primerjave med formulacijama so zato izključno opisne.

3 Rezultati

3.1 Umeritvena krivulja in analitska ustreznost metode

Umeritvena krivulja je bila pripravljena v koncentracijskem območju od 0,001 do 0,040 mg/mL. Vsaka izbrana koncentracija je bila analizirana v treh ponovitvah, za nadaljnjo obdelavo pa smo uporabili povprečno vrednost absorbance. Dobljena umeritvena krivulja je izkazovala linearno odvisnost med koncentracijo diklofenaka in absorbanco z enačbo regresijske premice $y = 27,338x + 0,0696$ (Graf 1).

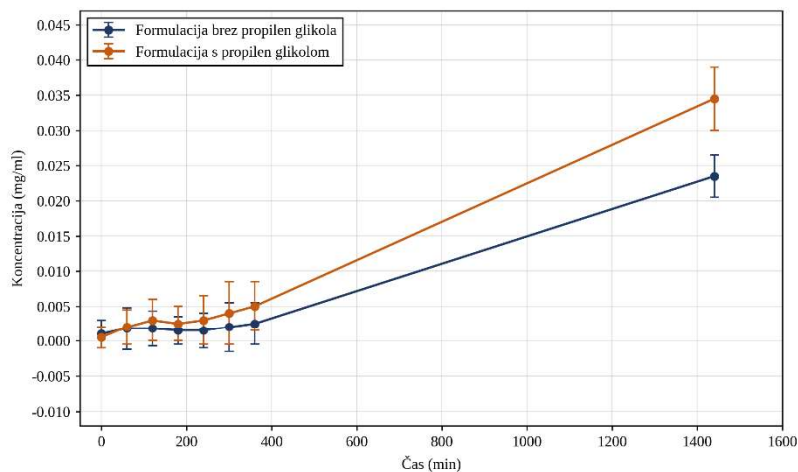
Korelacijski koeficient (R^2) je znašal 0,991, kar potrjuje dobro linearnost metode v obravnavanem koncentracijskem območju. Meja zaznave (LOD) je 0,00477 mg/mL, meja kvantifikacije (LOQ) pa 0,01446 mg/mL. Vrednost LOQ se nahaja znotraj kalibracijskega območja, kar potrjuje ustreznost izbire koncentracijskega razpona in zagotavlja zanesljivo kvantifikacijo v celotnem analiziranem območju.



Graf 1: Umeritvena krivulja diklofenaka.

3.2 Koncentracija diklofenaka v receptorskem mediju po časovnih točkah

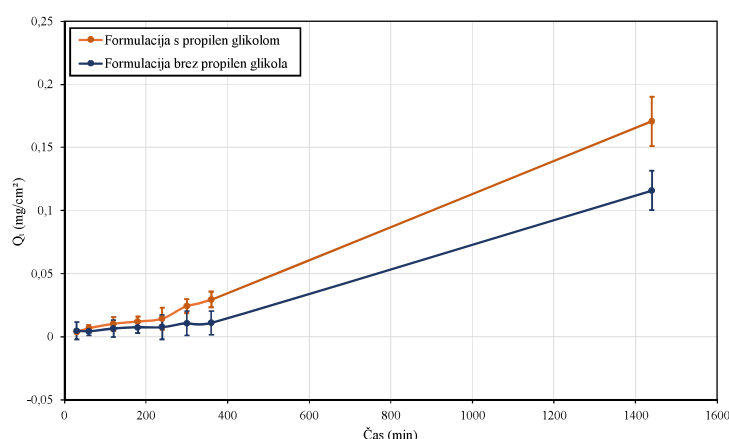
Pri obeh formulacijah je koncentracija diklofenaka v receptorskem mediju s časom naraščala, kar potrjuje postopno permeacijo učinkovine skozi membrano (Graf 2). V začetnih časovnih točkah (do približno 300 min) so bile koncentracije nizke in primerljive med formulacijama, variabilnost meritev pa relativno visoka. V kasnejših časovnih točkah se je koncentracija izraziteje povečala. Višje koncentracije so bile opažene pri formulaciji F2, kar nakazuje vpliv propilen glikola kot pospeševalca permeacije. Najvišje koncentracije so bile dosežene po 1440 minutah: F2 je dosegla $0,0345 \pm 0,0012$ mg/mL, F1 pa $0,0237 \pm 0,0143$ mg/mL.



Graf 2: Koncentracija diklofenaka v receptorskem mediju skozi čas.

3.3 Kumulativna količina permeiranega diklofenaka na površino

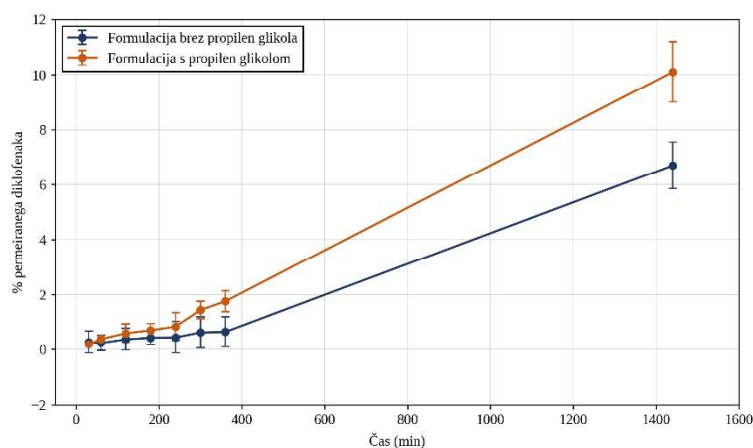
Kumulativno količino permeirane učinkovine smo izrazili na enoto površine membrane (Q_t , mg/cm²) v odvisnosti od časa; rezultati so predstavljeni kot povprečje treh paralelek $\pm$ standardni odklon (Graf 3). V začetnih časovnih točkah (do približno 300 min) so bile vrednosti Q_t nizke z majhnimi razlikami med formulacijama. Z naraščanjem časa se je permeacija izraziteje povečala, razlika med formulacijama pa postala bolj očitna. Po 1440 minutah je formulacija F2 dosegla $0,17085 \pm 0,00785$ mg/cm², formulacija F1 pa $0,11595 \pm 0,07115$ mg/cm². Velika standardna deviacija pri F1 odraža variabilnost med paralelkami, ki je bila posebej izrazita pri zadnji časovni točki, in ne napake v metodi.



Graf 3: Kumulativna količina permeiranega diklofenaka na enoto površine v odvisnosti od časa (mg/cm²).

3.4 Kumulativni delež permeiranega diklofenaka (%)

Ker se je začetna masa nanesene formulacije med paralelkami razlikovala, smo rezultate normalizirali glede na začetno maso diklofenaka (Graf 4). Kumulativni delež permeirane učinkovine (%) smo izračunali kot razmerje med kumulativno maso diklofenaka v receptorskem mediju in začetno maso diklofenaka v donorski formulaciji. Pri obeh formulacijah se je delež s časom postopno povečeval. V začetnih časovnih točkah so bile vrednosti nizke in primerljive, variabilnost pri F1 pa izrazitejša. Z naraščanjem časa so razlike postajale bolj očitne. Po 1440 minutah je F2 dosegla $9,68 \pm 0,58$ %, F1 pa $6,80 \pm 4,11$ %.



Graf 4: Normaliziran kumulativni delež permeiranega diklofenaka (%).

3.5 Odsotnost stacionarne faze permeacije

Pri analizi permeacijskih profilov obeh formulacij ni bilo mogoče opaziti jasno izražene linearne faze, ki bi ustrezala stacionarnemu stanju permeacije. Kumulativna količina permeirane učinkovine na površino v odvisnosti od časa (Graf 3) ni izkazovala linearne naraščanja v nobenem časovnem intervalu; namesto tega je bila opažena nelinearna rast skozi celotno trajanje poskusa. Zaradi odsotnosti stacionarne faze ni bilo mogoče zanesljivo določiti permeacijskih parametrov, kot so fluks v stacionarnem stanju, permeabilnostni koeficient in čas zakasnitve (T_{lag}). Rezultati so bili zato ovrednoteni na podlagi kumulativne količine permeirane učinkovine na površino ter kumulativnega deleža permeirane učinkovine.

4 Diskusija

4.1 Vpliv sestave formulacije na permeacijo diklofenaka

Rezultati permeacijske študije kažejo, da sestava formulacije odločilno vpliva na prehajanje diklofenaka skozi sintetično membrano Strat-M®. Formulacija F2 je pri daljših časovnih točkah dosegala višje koncentracije diklofenaka v receptorski fazi, večjo kumulativno količino permeirane učinkovine na enoto površine (Q_t) in večji normalizirani delež permeirane učinkovine kot F1. V začetnih časovnih točkah so bile razlike med formulacijama majhne, kar je mogoče pripisati difuzijskemu mehanizmu prehajanja, ki zahteva vzpostavitev koncentracijskega gradienta, in

procesu sproščanja učinkovine iz nosilca. Z daljšanjem časa eksperimenta se je razlika izraziteje povečala, kar kaže na postopen razvoj formulacijskega učinka.

Konsistentnost med absolutnimi (Q_t) in relativnimi (%) rezultati potrjuje, da opažene razlike izhajajo iz sestave formulacije in ne iz razlik v začetni masi nanosa. Ugotovljeni trend je skladen z ugotovitvami Pradal (2020), ki poroča, da se kumulativna absorpcija diklofenaka po 24 urah med komercialnimi pripravki z enako koncentracijo učinkovine razlikuje za več kot šestkrat, ter Pradal idr. (2019), ki ugotavljajo, da formulacije z nižjo koncentracijo diklofenaka a ugodnejšo sestavo nosilca dosegajo višjo permeacijo. Podobno so Sacha idr. (2019) pokazali, da že sprememba nosilca oziroma vgradnja diklofenaka v liposome opazno spremeni njegov *ex vivo* absorpcijski profil. Naši rezultati so s temi ugotovitvami skladni in dodatno potrjujejo, da je že dodatek ene same pomožne snovi, propilen glikola, zadosten za opazno spremembo permeacijskega profila.

Povečana permeacija pri formulaciji F2 je razložljiva z uveljavljenimi mehanizmi delovanja propilen glikola kot pospeševalca permeacije. Molekularne simulacije (Mistry in Notman, 2024) kažejo, da se propilen glikol lokalizira na meji polarnih glav lipidov v dvoslojih rožene plasti, kjer poruši urejeno strukturo lipidov in zmanjša energijsko bariero za difuzijo. Ker membrana Strat-M® z lipidno sestavo posnema stratum corneum, propilen glikol na podoben način poruši njeno integriteto. Poleg tega deluje kot ko-solvent, ki povečuje topnost diklofenaka in njegovo termodinamsko aktivnost, s čimer poveča gonilno silo za difuzijo skozi membrano (Carrer idr., 2020). Kombinirani učinek motenj lipidne bariere in povečane termodinamske aktivnosti učinkovine je v skladu s konceptom *solute-vehicle-skin* interakcij, ki ga opisujejo Tapfumaneyi idr. (2025).

Uporaba membrane Strat-M® v naši raziskavi je skladna z njeno široko validacijo v literaturi kot zanesljivega modela za *in vitro* permeacijske teste. Naši rezultati potrjujejo, da je membrana dovolj občutljiva za zaznavanje razlik med formulacijama kljub njuni sicer zelo podobni sestavi. Hkrati pa Strat-M® ne vključuje bioloških dejavnikov, kot so encimska aktivnost, aktivni transport, krvni obtok ali variabilnost med posamezniki, zato je interpretacijo rezultatov potrebno obravnavati v kontekstu *in vitro* pogojev (Salminen idr., 2023).

Permeacijski profili obeh formulacij niso izkazovali linearnega naraščanja v nobenem časovnem intervalu, kar pomeni, da sistem v času trajanja eksperimenta ni dosegel stacionarnega stanja. Posledično ni bilo mogoče določiti fluksa v stacionarnem stanju, permeabilnostnega koeficienta in T_{lag} . Nelinearen profil je verjetno posledica omejene difuzije skozi membrano, interakcij med formulacijo in membrano ali nezadostnega trajanja eksperimenta. Manjkajoče vzorčenje med 5. in 24. uro dodatno omejuje interpretacijo kinetike permeacije, saj ni mogoče izključiti, da je sistem v tem intervalu že dosegel linearno fazo.

Statistična analiza razlik med formulacijama ni bila izvedena zaradi majhnega števila paralelk ($n = 3$), kar predstavlja inherentno omejitev te pilotne študije. Kljub temu so vsi analizirani parametri medsebojno skladni in konsistentno kažejo na povečano permeacijo diklofenaka v prisotnosti propilen glikola. Za nadgradnjo študije bomo podaljšali trajanje eksperimenta za doseg stacionarnega stanja in izračun farmakokinetičnih parametrov, povečali frekvenco vzorčenja med 5. in 24. uro ter bomo dodatno izvedli analizo zadrževanja diklofenaka v membrani po zaključku eksperimenta. Slednja bi omogočila razlikovanje med permeirano in zadržano frakcijo ter boljšo oceno dejanske razpoložljivosti učinkovine. Rezultate bi bilo nadalje smiselno preveriti na biološko relevantnejših modelih, kot je *ex vivo* človeška ali živalska koža, kar bi omogočilo boljšo translacijo ugotovitev v klinični kontekst.

5 Zaključek

Izvedena *in vitro* permeacijska študija je pokazala, da dodatek propilen glikola kot pospeševalca permeacije opazno vpliva na prehajanje natrijevega diklofenaka skozi sintetično membrano Strat-M®. Formulacija F2 je dosegla višje koncentracije diklofenaka v receptorskem mediju, večjo kumulativno količino permeirane učinkovine na enoto površine in večji delež permeirane učinkovine v primerjavi s formulacijo F1. Opazovani učinek je skladen z uveljavljenimi mehanizmi delovanja propilen glikola, ki vključujeta motnje v lipidni strukturi membrane ter povečanje topnosti in termodinamske aktivnosti učinkovine. Rezultati potrjujejo, da je pri razvoju topičnih pripravkov poleg koncentracije učinkovine ključnega pomena skrbno načrtovanje sestave formulacije, ter da Strat-M® membrana predstavlja občutljiv in reproducibilen model za vrednotenje takšnih razlik v zgodnjih fazah razvoja.

Opombe

Kratice, uporabljene v besedilu:

COX-1: ciklooksigenaza-1

COX-2: ciklooksigenaza-2

DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12

F1 – formulacija 1 (Pentravan® + 1 % (m/m) diklofenaka)

F2 – formulacija 2 (Pentravan® + 1 % (m/m) diklofenaka + propilen glikol)

FBS: fetalni goveji serum

LOD: meja zaznave

LOQ: meja kvantifikacije

NSAID: nesteroidna protivnetna zdravila

Q_t : kumulativna količina permeirane učinkovine na enoto površine v času t

SD: standardni odklon

Strat-M®: sintetična membrana za *in vitro* permeacijske študije

Tlag: čas zakasnitve

UV-Vis: ultravijolična-vidna spektrofotometrija

Zahvala

Avtorji se zahvaljujejo Javni agenciji za znanstveno-raziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo v okviru programske skupine P3-0036 ter raziskovalnih projektov L7-4494, J3-60058. in J2-70083.

Extended abstract

This study aimed to evaluate the effect of propylene glycol as a permeation enhancer on the *in vitro* permeation of diclofenac sodium from compounded topical formulations using a Strat-M® synthetic membrane model. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as diclofenac, are widely used due to their ability to provide localized therapeutic effects while minimizing systemic exposure. However, their clinical efficacy strongly depends on formulation composition, as the stratum corneum represents a major barrier to drug permeation.

Two magistral formulations based on the Pentravan® transdermal base were investigated: one containing 1% (w/w) diclofenac sodium without a permeation enhancer (F1), and another containing the same concentration of diclofenac with 24% (w/w) propylene glycol (F2). The permeation study was conducted using Franz diffusion cells under controlled conditions, with Strat-M® membranes serving as a synthetic model of human skin. Diclofenac concentrations in the receptor medium were determined using UV-Vis spectrophotometry at 289 nm, the absorption maximum confirmed by full

spectrum scanning. The specificity of the method was ensured by using pure receptor medium (Advanced DMEM/F-12 with 5% FBS) as blank, eliminating the contribution of medium components to measured absorbance. Cumulative permeated amount per unit area (Q_t) and normalized permeation percentage were calculated with standard volume-correction accounting for sample withdrawal and medium replacement.

The results demonstrated a time-dependent increase in diclofenac permeation for both formulations, confirming gradual diffusion across the membrane. In the initial phase, differences between formulations were minimal, likely due to the time required for drug release from the vehicle and the establishment of a concentration gradient. As the experiment progressed, formulation F2 consistently exhibited higher diclofenac concentrations, greater cumulative permeated amounts, and higher normalized permeation percentages compared to F1. After 24 hours, F2 reached $170.85 \pm 7.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $9.68 \pm 0.58\%$, compared to $115.95 \pm 71.15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $6.80 \pm 4.11\%$ for F1.

The enhanced permeation of F2 can be explained by the dual mechanism of propylene glycol: disruption of the lipid organization within the membrane barrier, reducing the energy barrier for diffusion, and co-solvent action increasing drug solubility and thermodynamic activity within the formulation (Mistry in Notman, 2024; Carrer idr., 2020). These combined effects are consistent with the concept of solute–vehicle–skin interactions (Tapfumaneyi idr., 2025).

Permeation profiles did not reach a steady-state phase during the experimental period, precluding the determination of steady-state flux, permeability coefficient, and lag time. Additional limitations include the small number of replicates ($n = 3$), which restricted statistical analysis, and the inherent limitations of the synthetic membrane model that does not fully replicate human skin complexity, including metabolic activity and physiological variability.

Nevertheless, the Strat-M® membrane proved to be a sensitive and reproducible model capable of distinguishing between formulations with subtly different compositions. The study confirms that even a single excipient, such as propylene glycol, can meaningfully alter permeation behaviour, and underscores the importance of rational formulation design in topical drug delivery.

Literatura

- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R. in Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology*, 33(1), 1–5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>
- Bouwer, F., Brits, M. in Viljoen, J. M. (2025). Cracking the skin barrier: Models and methods driving dermal drug delivery. *Pharmaceutics*, 17(12), 1586. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17121586>
- Brito, S., Baek, M. in Bin, B. H. (2024). Skin structure, physiology, and pathology in topical and transdermal drug delivery. *Pharmaceutics*, 16(11), 1403. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111403>
- Carrer, V., Alonso, C., Pont, M., Zanuy, M., Córdoba, M., Espinosa, S. in García, M. L. (2020). Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. *Archives of Dermatological Research*, 312(5), 337–352. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-02017-5>

- Derman, I. D., Rivera, T., Garriga Cerda, L., Singh, Y. P., Saini, S., Abaci, H. E., (2025). Advancements in 3D skin bioprinting: Processes, bioinks, applications and sensor integration. *International Journal of Extreme Manufacturing*, 7(1), 012009. <https://doi.org/10.1088/2631-7990/ad878c>
- Derry, S., Conaghan, P., Silva, J. A. P., Wiffen, P. in Moore, R. (2016). Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007400.pub3>
- Derry, S., Moore, R., Gaskell, H., McIntyre, M. in Wiffen, P. (2015). Topical NSAIDs for acute musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007402.pub3>
- <https://doi.org/10.1088/2631-7990/ad878c>Footner, E., Firipis, K., Liu, E., Baker, C., Foley, P., Kapsa, R. M. I., Pirogova, E., O'Connell, C. in Quigley, A. (2023). Layer-by-layer analysis of in vitro skin models. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(11), 5933–5952. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.3c00283>
- Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., Joshi, V. in Michniak-Kohn, B. (2018). Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1–2), 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.012>
- Hofmann, E., Schwarz, A., Fink, J., Kamolz, L. P. in Kotzbeck, P. (2023). Modelling the complexity of human skin in vitro. *Biomedicines*, 11(3), 794. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030794>
- Honari, G., Andersen, R. in Maibach, H. L. (2017). *Sensitive skin syndrome* (2 ed.). CRC Press.
- Jeong, W. Y., Kwon, M., Choi, H. E. in Kim, K. (2021). Recent advances in transdermal drug delivery systems: A review. *Biomaterials Research*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00226-6>
- Kaur, L., Singh, K., Paul, S., Singh, S., Singh, S. in Jain, S. K. (2018). A mechanistic study to determine the structural similarities between artificial membrane Strat-M™ and biological membranes and Its Application to Carry Out Skin Permeation Study of Amphotericin B Nanoformulations. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1606–1624. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0959-6>
- Kaushik, V., Schatton, W. in Keck, C. (2024). Influence of type of vehicle on dermal penetration efficacy of hydrophilic, amphiphilic, lipophilic model drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 200, 114305. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114305>
- Kichou, H., Bonnier, F., Dancik, Y., Bakar, J., Michael-Jubeli, R., Caritá, A. C., idr. (2023). Strat-M® positioning for skin permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 647, 123488. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123488>
- Kis, N., Gunnarsson, M., Berkó, S. in Sparr, E. (2022). The effects of glycols on molecular mobility, structure, and permeability in stratum corneum. *Journal of Controlled Release*, 343, 755–764. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.02.007>
- Lee, D. H., Lim, S., Kwak, S. S. in Kim, J. (2024). Advancements in skin-mediated drug delivery: Mechanisms, techniques and applications. *Advanced Healthcare Materials*, 13(7), 2302375. <https://doi.org/10.1002/adhm.202302375>
- Lopez-Ojeda, W., Pandey, A., Alhajj, M. in Oakley, A. M. (2025). Anatomy, skin (integument). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/>
- Manian, M., Jain, P., Vora, D. in Banga, A. K. (2022). Formulation and evaluation of the in vitro performance of topical dermatological products containing diclofenac sodium. *Pharmaceutics*, 14(9), 1892. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091892>
- Meng, Y., Feng, L., Shan, J., Yuan, Z. in Jin, L. (2022). Application of high-frequency ultrasound to assess facial skin thickness in association with gender, age, and BMI in healthy adults. *BMC Medical Imaging*, 22(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12880-022-00839-w>

- Menon, G. K., Cleary, G. W. in Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>
- Milanowski, B., Wosicka-Frąckowiak, H., Głowska, E., Sosnowska, M., Woźny, S., Stachowiak, F., Suchenek, A. in Wilkowski, D. (2021). Optimization and Evaluation of the In Vitro Permeation Parameters of Topical Products with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs through Strat-M® Membrane. *Pharmaceutics*, 13(8), 1305. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081305>
- Mistry, J. in Notman, R. (2024). Mechanisms of the drug penetration enhancer propylene glycol interacting with skin lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(16), 3885–3897. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.3c06784>
- Nair, R. S., Billa, N. in Morris, A. P. (2025). Optimizing in vitro skin permeation studies to obtain meaningful data in topical and transdermal drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, 26, 147. <https://doi.org/10.1208/s12249-025-03143-2>
- Niehues, H., Bouwstra, J. A., El Ghalbzouri, A., Brandner, J. M., Zeeuwen, P. L. J. M. in van den Bogaard, E. H. (2018). 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Experimental Dermatology*, 27(5), 501–511. <https://doi.org/10.1111/exd.13531>
- Oltulu, P., Ince, B., Kokbudak, N., Findik, S. in Kilinc, F. (2018). Measurement of epidermis, dermis, and total skin thicknesses from six different body regions with a new ethical histometric technique. *Turkish Journal of Plastic Surgery*, 26(2), 56. https://doi.org/10.4103/tips.TJPS_2_17
- Patel, A., Iliopoulos, F., Caspers, P., Puppels, G. in Lane, M. E. (2021). In vitro–in vivo correlation in dermal delivery: The role of excipients. *Pharmaceutics*, 13(4), 542. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040542>
- Pennick, G., Robinson-Miller, A. in Cush, I. (2021). Topical NSAIDs for acute local pain relief: in vitro characterization of drug delivery profiles into and through human skin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. <https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1935996>
- Pradal, J. (2020). Comparison of Skin Permeation and Putative Anti-Inflammatory Activity of Commercially Available Topical Products Containing Ibuprofen and Diclofenac. *Journal of Pain Research*, 13, 2805–2814. <https://doi.org/10.2147/JPR.S262390>
- Pradal, J., Vallet, C. M., Frappin, G., Bariguan, F. in Lombardi, M. (2019). Importance of the formulation in the skin delivery of topical diclofenac: not all topical diclofenac formulations are the same. *Journal of Pain Research*, 12, 1149–1154. <https://doi.org/10.2147/JPR.S191300>
- Rannou, F., Pelletier, J. in Martel-Pelletier, J. (2015). Efficacy and safety of topical NSAIDs in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(4), S18–S21. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.11.007>
- Sacha, M., Faucon, L., Hamon, E., Ly, I. in Haltner-Ukomadu, E. (2019). Ex vivo transdermal absorption of a liposome formulation of diclofenac. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 785–790. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.079>
- Salminen, A. T., Davis, K. J., Felton, R. P., Nischal, N., VonTungeln, L. S., Derr, K., Beland, F. A., Derr, K., Brown, P. C., Ferrer, M., Katz, L. M., Kleinstreuer, N. C., Leshin, J., Manga, P. Sadrieh, N., Xia, M., Fitzpatrick, S. C. in Camacho, L. (2023). Parallel evaluation of alternative skin barrier models and excised human skin for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in Vitro*, 91, 105630. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105630>
- Shuster, S., Black, M. M. in McVitie, E. (1975). The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *British Journal of Dermatology*, 93(6), 639–643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1975.tb05113.x>

- Tapfumaneyi, P., Phan, K., Huang, Y., Sodsri, K., Namjoshi, S., Maibach, H. in Mohammed, Y. (2025). Solute–vehicle–skin interactions and their contribution to pharmacokinetics of skin delivery. *Pharmaceutics*, 17(6), 764. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060764>
- Wennberg, C., Lundborg, M., Lindahl, E. in Norlén, L. (2023). Understanding drug skin permeation enhancers using molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(15), 4900–4911. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00625>
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C. in Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, 25(2), 92–98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>
- Zhao, L., Chen, J., Bai, B., Song, G., Zhang, J., Yu, H., Huang, S., Wang, Z. in Lu, G. (2024). Topical drug delivery strategies for enhancing drug effectiveness by skin barriers, drug delivery systems and individualized dosing. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1333986>