

히알루론산의 각질 유동성 향상을 통한 주름 개선 펩타이드 피부 흡수 촉진

김윤선[†] · 김대현 · 김유미 · 박선규 · 이천구 · 강내규

(주) LG생활건강 기술연구원
(2018년 10월 31일 접수, 2018년 12월 17일 수정, 2018년 12월 19일 채택)

Hyaluronic Acid Enhances the Dermal Delivery of Anti-wrinkle Peptide via Increase of Stratum Corneum Fluidity

Yun-Sun Kim[†], Daehyun Kim, Yumi Kim, Sun-Gyoo Park, Cheon-Koo Lee, and Nae-Gyu Kang

LG Science Park, LG Household & Healthcare Ltd., 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul 07795, Korea
(Received October 31, 2018; Revised December 17, 2018; Accepted December 19, 2018)

요약: 아세틸 헥사펩타이드 8 (AH8)은 보톡스 메커니즘을 응용한 주름 개선 펩타이드 소재로, 보톡스의 타겟인 synatosomal-associated protein 25 (SNAP25) N말단 서열을 모방하여 개발되었다. 주름 개선 효과가 보고되고 있지만 큰 분자량과 친수성 성질에 의하여 피부 흡수는 잘 되지 않는다는 문제가 있다. 따라서 피부 보습 성분 중에서 AH8의 피부 흡수를 증가시켜 줄 수 있는 물질을 탐색하였는데, 히알루론산(HA)이 AH8의 피부 흡수를 증가시켰다. 형광물질로 표지한 AH8만 Micropig[®] skin 에 발라주면 대부분 각질을 투과하지 못하고 각질층에 존재하였다. 반면, HA를 함께 도포한 경우에는 각질층을 투과하여 표피, 진피로 흡수된 AH8가 증가하는 것을 형광 이미지 분석을 통해 확인했다. 특히 5 kDa 저분자량 HA가 500 kDa, 2000 kDa HA보다 피부 흡수를 더 많이 증가시켰다. HA가 피부 각질층에 미치는 영향을 푸리에변환 적외 분광법(Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)으로 분석해보니, 고분자량 HA는 각질 수분 함량을 증가시키고, 저분자량 HA는 지질층의 유동성을 증가시키는 경향성이 있었다. 따라서 HA는 AH8의 피부 흡수를 증가시켜 주름 개선 효과를 향상시켜 줄 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: Acetyl hexapeptide 8 (AH8) is a synthetic peptide for anti-wrinkle cosmetics ingredient. It was developed as a mimetic of botox, patterned after N-terminal end of the protein synatosomal-associated protein 25 (SNAP25), a substrate of botulinum toxin. While AH8 has good efficacy and safety profiles, the permeation through the skin is poor. Therefore, we tried to enhance the transdermal delivery of AH8 by using of hyaluronic acid (HA), a linear polysaccharide of N-acetyl glucosamine and glucuronic acid. To investigate the effect of HA on AH8 penetration, we analyzed paraffin sections of Micropig[®] skin. Fluorescence labeled AH8 was applied to micropig skin with or without HA. The absorption of AH8 was limited to the stratum corneum (SC) without HA. On the other hand, AH8 penetrated to the dermis with HA. Especially, low molecular weight HA (5 kDa) was most efficient compared to 500 kDa HA and 2000 kDa HA. Experiments using fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy revealed that lower molecular weight HA had a tendency to increase the fluidity of the SC lipids more, which means enhancing the skin penetration. Therefore, HA could be expected to enhance the anti-wrinkle effect of AH8.

Keywords: hyaluronic acid, acetyl hexapeptide 8, skin penetration, skin hydration, stratum corneum fluidity

[†] 주 저자 (e-mail: yunsunkim@lghnh.com)
call: 02)6980-1754

1. 서 론

최근 피부 질환 개선 및 피부 미용 목적으로 단백질, 펩타이드, DNA 등의 생물학적 소재 활용이 증가하고 있다. 피부 재생 효능의 EGF, PDRN, 주름 개선 소재인 AH8 등이 대표적인 예이다. 하지만 이런 소재들은 분자량이 크거나 친수성이며 전하를 띠는 경우도 있어 피부로 흡수가 제한적이다[1-3]. AH8은 보톡스 메커니즘을 응용한 주름 개선 소재로, 근신경 접합부의 신경 말단에서 신경 전달 물질을 분비 시키는 SNARE complex의 구성 단백질인 SNAP-25의 염기서열을 모방하여 개발되었으며, SNARE complex 형성을 방해하여 신경 전달 물질 분비를 억제한다[4-8]. EEMQRR 6개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드로 분자량이 889 g/mol에 달하고 logP는 - 6.3으로 낮아 피부로 흡수가 어려울 것으로 예상된다[4]. 실제로 10% AH8을 human cadaver skin에 도포한 연구에서 각질층 잔존량은 0.22%, 표피 흡수율은 0.01% 정도에 불과했다[8]. AH8은 zwitterions으로 존재하여 친수성을 띠며 피부 흡수를 어렵게 한다. 따라서 zwitterions이 덜 생기는 방향으로 구조를 변형시켜 친수성을 낮추고 소수성을 높여 피부 흡수를 높이려는 시도도 연구되고 있지만 구조 변형된 신규물질의 안전성이 보장되지 않았다[4]. 그 밖에도 AH8 피부 흡수를 높이기 위한 제형연구, 물리적 흡수 촉진 기구 사용에 대한 연구들이 보고되고 있다[9-10].

유효 성분의 피부 전달을 향상시키기 위해 각질의 장벽 기능과 경피 흡수를 증가시킬 수 있는 메커니즘에 대한 이해가 필요하다. 물질의 피부 흡수를 막는 장벽 기능은 피부 최외각층에 존재하는 각질층(stratum corneum)이 담당하는데, 각질층은 케라틴 섬유로 구성된 각질세포(corneocyte)층과 이를 메우고 있는 다중판 구조의 각질 세포간 지질(multilamella intercellular lipid)로 구성된다[11]. 피부 흡수를 촉진하기 위해 화학적 침투 촉진제(chemical penetration enhancers)가 많이 사용되어 왔다. 알코올, azone, fatty acid 등은 세포간 지질의 head group과 작용하여 지질층의 배열을 변형시키거나 지질층의 수분 함량을 높여 극성 물질의 침투를 용이하게 한다. 이온성 계면활성제나 decylmethylsulfoxide는 각질 세포의 케라틴의 치밀함을 감소시켜 투과성이 좋게 변형시킨다. 그리고 각질층으로 약물의 분배(partitioning)를 증가시키는 용매들도 피부 흡

수를 향상시킨다[12-13]. 최근에는 각질층 구성 성분의 구조 변화에 따른 유동성 향상 메커니즘으로 극성, 비극성 물질의 각질 투과를 증가시킬 수 있다고 설명하기도 한다[11,14-15]. 피부 각질을 이루는 지질과 단백질의 대부분이 고형상태로 존재하는데, 각질이 수화된 상태에서는 일부분이 움직임이 자유로워지고 유동성이 증가한다[16-20]. 우레아(urea), 글리세롤(glycerol)과 같은 보습제도 각질층의 유동성을 증가시킬 수 있다[20-21].

히알루론산(HA)은 N-아세틸글루코사민과 글루쿠론산으로 이루어진 고분자 화합물로 대표적인 피부 보습 성분이며, 피부 탄력 개선, 피부 상처 재생 효과가 있다[22]. HA는 약물의 경피 흡수를 개선시킨다는 연구 결과들도 보고되고 있다. FDA 승인 의약품 Solaraze (3% 디클로페낙, 2.5% HA)의 경우는 HA가 300 Da 크기의 디클로페낙 각질 투과를 촉진하고 표피 잔류를 향상시켰다[23]. 저분자 의약품 뿐만 아니라 60 kD 크기의 단백질인 BSA의 각질 투과를 증가시키는 연구결과도 보고되었다[1]. 게다가 HA는 단백질 안정화 작용도 하는 것으로 알려져 있기 때문에[24-26] 단백질, 펩타이드 등의 생물학적 소재를 함유하는 제제를 개발하는 데 있어 활용성이 높아 보인다. 본 연구에서는 HA이 주름 개선 펩타이드인 AH8의 피부 흡수에 도움을 주는지 Micropig[®] skin을 이용한 경피 흡수 모델에서 확인해 보았다. 또한 푸리에변환 적외 분광법(Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)을 통해 HA가 피부 각질에 어떻게 작용하는지도 확인해 보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. Materials

FITC를 표지한 AH8 (AH8-FITC, Acetyl-EEMQRRK-FITC, M.W. 1406.88)은 펩트론(Korea)에서 주문 제작하였다. 2000 kDa HA는 Shandong Freda Biopharm (China), 5 kDa HA, 500 kDa HA는 바이오랜드(Korea)에서 구매하였다.

2.2. Skin Penetration Experiments

형광물질로 표지된 물질을 돼지 피부에 도포한 후 형광 이미지로 흡수정도를 분석하는 방법[1]을 변형하여 실험하였다.

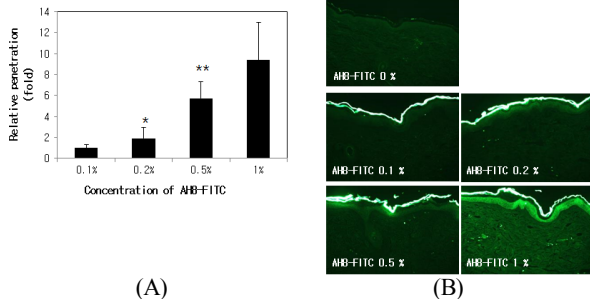


Figure 1. Skin delivery of AH8-FITC. (A) The absorption of AH8-FITC to the dermis after applying indicated doses of AH8-FITC (in aqueous solution) was analyzed. The relative penetrations were calculated compared to the 0.1% AH8-FITC treated group (* $p < 0.5$, ** $P < 0.005$). (B) The distribution of AH8-FITC in the skin layers after O/N treatment of the peptide.

HA 선처리 조건: 60 mm dish에 PBS 1 mL를 넣고 멸균거즈를 깔아주고 그 위에 1 mm 두께의 연구용 Micropig[®] skin (메디키네틱스, Korea)을 놓아 피부가 마르지 않게 해주었다. Micropig[®] skin 직경 1.7 cm 영역에 HA 3 μ L를 발라주고 5 min 후 물에 녹인 AH8-FITC 3 μ L를 발라주었다. 4 h 후 표피를 물로 닦아주고 피부를 65 $^{\circ}$ C에 20 s 동안 담가 준 후 표피층을 분리하였다. 4 mm 바이오펜치로 진피층을 펀칭하여 조각 1개를 200 μ L PBS에 넣은 후 1 h 동안 sonication 한 후 원심분리 하였다. 상층액에 있는 형광물질의 양을 Victor³ (Perkinelmer, USA)로 측정하였다. 흡수량은 AH8-FITC 단독 처리군의 형광 값을 기준으로 relative penetration (fold)으로 정리하였다.

무한 도포 조건: Franz diffusion cell 사이에 Micropig[®] skin을 놓고, 피부 위에 AH8-FITC를 HA 용액에 녹여 20 μ L 용량으로 도포하였다. 37 $^{\circ}$ C 항온 항습기에서 O/N 후, 4% 포름알데히드로 고정하여 파라핀 블록을 만들고 조직 slide를 만들었다. 조직 내 흡수된 AH8-FITC는 EVOS[®] cell imaging system (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 분석하였다.

2.3. Non-invasive Investigation of the HA Effect on the Human Stratum Corneum

HA의 인체 각질 구조에 미치는 영향 연구는 IRB 심의 후 피험자 동의를 얻어 수행되었다(LG-WRNK-2018-1002). 30대 여성 3명이 참여하였으며, HA 1% 용액을 4 h 동안

상완에 도포한 후 물로 세척 건조하였다. 각질테이프(D100-D-Squame Standard Sampling Discs)로 각질을 떼어내어 수화 정도와 지질층의 유동성 변화를 FTIR (AVATAR 320, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 분석하였다. 첫 번째 각질 테이프는 HA액이 남아 있을 수 있어서 두 번째로 각질을 떼어낸 각질 테이프를 비교 분석하였다.

2.4. 통계 분석

본 연구의 실험은 두 번 이상 수행하였으며, 이때 결과 값들은 mean \pm SD로 나타내었다. 실험 군에 따른 데이터 사이의 통계적 유의성 검정은 two-tailed Student's *t*-test를 통하여 검증하였고, P 값이 0.05 이하일 경우 통계학적으로 유의적인 차이가 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 주름 개선 펩타이드의 피부 흡수

Micropig[®] skin을 이용한 경피 흡수 모델에서 AH8의 피부 흡수 정도를 형광 분석법을 통해 측정하기 위하여 AH8에 FITC를 표지하였다. 0.1% (1 mg/mL) ~ 1% (10 mg/mL)의 AH8-FITC를 물에 녹여 직경 1.7 cm의 Micropig[®] skin에 3 μ L를 발라주고 4 h 후 진피로의 흡수 정도를 비교하였더니 농도가 증가할수록 흡수량이 증가하였다(Figure 1A). Micropig[®] skin에 시료를 발라주는 경우는 시료가 고르게 도포되지 않아 Franz diffusion cell을 이용하여 무한 선량 접근법(infinite-dose approach)을 적용하여 다시 확인해 보았다. Micropig[®] skin을 파라핀으로 고정 후 조직 slide를 FITC 형광 이미지로 분석해 보니 AH8-FITC 대부분이 각질층에 존재하고 있었다. 형광 이미지 분석 결과, 0.2% 이상 도포해 준 경우 표피층까지 전달되는 것이 관찰되었고, 1% 이상 도포할 경우는 진피에서도 AH8-FITC가 존재하는 것이 측정되었다(Figure 1B). 0.1% 도포의 경우 조직 이미지에서는 주로 각질층에 존재하고 표피와 진피로 전달이 되지 않은 것으로 보이지만, 진피 조직을 분리하여 AH8-FITC를 추출한 경우에는 측정이 되어 0.1% 발라준 경우도 진피까지 전달이 되고 있음을 알 수 있었다(Figure 1A).

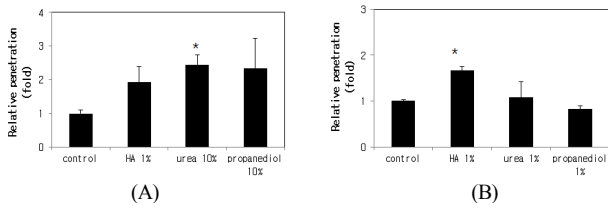


Figure 2. Increased skin delivery of AH8-FITC by skin hydrating agents. (A,B) After pretreatment of indicated materials, 0.1% of AH8-FITC were applied on Micropig[®] skin. The relative penetrations to the dermis were calculated compared to the AH8-FITC treated control group (**p* < 0.5).

2000 kDa으로 물에 분산이 잘 되지 않아 1%로 적용하였다. 우레아, 프로판디올을 1%로 적용한 경우에는 펩타이드의 피부 흡수를 증가시키지 못하였다(Figure 2B). 우레아, 프로판디올과 비교하여 HA가 뛰어나 피부 흡수 향상을 보이는 것은 HA는 고분자 화합물이기 때문일 수도 있다. HA가 양전하를 띠는 단백질과 이온 결합을 통해 nanocomplex를 형성한 것처럼[26], AH8-FITC의 입자 사이즈를 작게 하여 피부 흡수에 도움을 주었을 수도 있지만 실험을 통해 확인이 필요하다.

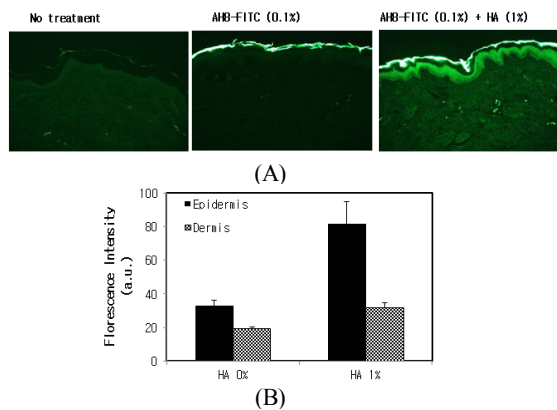


Figure 3. HA enhanced stratum corneum penetration of AH8-FITC. 0.1% AH8-FITC dissolved in 1% HA solution was applied on Micropig[®] skin (A). The fluorescent intensity in the epidermis and the dermis was analyzed by using imageJ (B).

3.3. HA에 의한 주름 개선 펩타이드 피부 흡수 촉진

HA를 피부에 전 처리 한 경우 AH8-FITC의 각질 투과 및 진피층으로 흡수가 증가되었는데, HA 용액에 AH8-FITC를 혼합하여 동시에 도포한 경우에도 흡수를 촉진시키는지 다시 확인해 보았다. HA 1% 용액에 AH8-FITC 0.1%를 혼합하여 Franz diffusion cell 사이의 Micropig[®] skin 위에 도포해준 경우, 조직 slide를 이미지로 분석했을 때 표피와 진피에서 형광 시그널이 증가하였다(Figure 3A). 펩타이드만 도포한 경우 대부분 각질층에서 형광 시그널이 나타났지만, HA에 의하여 표피층의 형광 밴드가 진해졌으며, 진피층에서도 형광 스팟이 나타났다. 형광 세기를 ImageJ로 분석해보니, HA에 의하여 표피와 진피에서 각각 약 2.4배, 약 1.6배 증가하였다(Figure 3B).

3.2. 보습에 의한 주름 개선 펩타이드의 피부 흡수 향상

각질은 수화 상태에 따라 단백질, 지질 성분의 유동성이 달라져 피부 흡수에 영향을 줄 수 있다[16-20]. 본 연구팀은 이전 연구에서 HA, 우레아, 트레할로스 등이 각질의 수분 함량을 증가시키는 것을 확인한 바 있어 [27], 이 성분들이 AH8-FITC의 피부 흡수에 영향을 주는지 확인해 보았다. Micropig[®] skin에 보습제를 먼저 발라준 후 0.1%의 AH8-FITC를 발라주었다. 4 h 후 진피를 분리하여 진피층에 존재하는 형광물질의 양을 측정해 보았다. HA 1%는 약 2배 정도 펩타이드의 진피 흡수량을 증가시켰다. 우레아 10%, 프로판디올 10% 도 펩타이드의 흡수를 향상시켰다(Figure 2A). 하지만 트레할로스 10%는 펩타이드 흡수를 증가시키지 않았다 (data not shown). 본 실험에서 사용한 HA는 분자량이

HA는 N-아세틸글루코사민(N-acetyl glucosamine)과 글루쿠론산(glucuronic acid)으로 이루어진 고분자 화합물로 다양한 분자량의 형태로 존재한다. HA 분자량에 따라 피부 흡수에 미치는 영향이 다를 수 있기 때문에 약 2000 kDa, 약 500 kDa, 약 5 kDa 분자량의 HA이 AH8-FITC의 피부 흡수에 어떤 영향을 주는지 비교해 보았다. 0.05%의 AH8-FITC를 0.5% HA 용액에 혼합한 후 Micropig[®] skin에 고르게 도포해 준 경우, HA 분자량이 작아질수록 각질 투과가 증가하여 표피층 형광 밴드가 진해지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

3.4. HA에 의한 각질층 유동성 향상

HA에 의해 펩타이드의 각질 투과가 증가하는 메커니즘을 이해하기 위하여 HA에 의한 각질층의 변화에 대해 살펴보았다. HA는 돼지 피부에서 분리한 SC sheets 모델에서 피부 수분 보유량을 높이고, 각질 구성 성분의 구조를 변형시켜 유동성을 증가시켰다[1]. HA

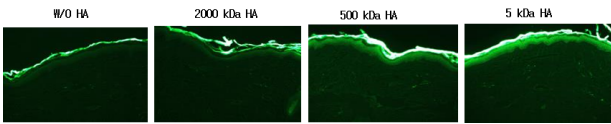


Figure 4. Penetration enhancing effect of different molecular weight HA. 0.05% AH8-FITC dissolved in 0.5% of indicated molecular weight HA solution was applied on Micropig[®] skin for O/N.

가 인체 피부의 각질 구조도 변화시키는지 확인해 보았다. 분자량이 다른 세 종류의 HA 1% 용액을 피부에 도포한 후 각질을 채취하여 FTIR으로 분석하였다. 각질의 수화정도는 O-H stretching absorbance ($3000\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$)의 면적을 비교하여 분석하였다[27]. 그 결과, 통계적 유의성은 없지만 500 kDa와 2000 kDa HA를 도포한 경우 각질층 수분 함량이 증가하고, 분자량이 클수록 수화 정도가 증가하는 경향이 있음을 알 수 있었다 (Figure 5A). 각질 세포간 지질의 lipid bilayers의 구조는 $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ 과 $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ 근처에서 나타나는 CH_2 의 대칭(symmetric)과 반대칭(asymmetric) stretching variation으로 알아볼 수 있다. Stretching band가 낮은 파장으로 이동하는 것은 지질층 구조의 규칙성이 감소하여 gel에서 lipid crystalline 구조로 변형되는 것을 의미한다. 이러한 변화는 지질층의 유동성을 증가시키므로 피부 흡수를 증가시킬 수 있다[28]. 5 kDa의 HA를 피부에 발라준 경우 반대칭(asymmetric) stretching band의 이동경향성이 관찰되었다(Figure 5B). 종합해보면 HA 분자량이 커질수록 각질 수화 작용이 우수하고 분자량이 작을수록 지질층 유동성을 향상시키는 것으로 보인다. Figure 4에서 분자량이 작을수록 AH8-FITC의 각질 투과가 증가하고 진피층으로 흡수가 증가하였다. 고분자량 HA에 의한 각질 수화 작용에 의해서도 각질 투과가 증가할 수 있지만 저분자량 HA에 의한 지질층 유동성 증가 현상이 AH8의 각질 투과를 더 효과적으로 촉진하는 것으로 사료된다. 물론, 저분자량 HA 자체가 고분자량 HA보다 피부 침투력이 좋아 co-transport 효과에 의해 AH8 흡수에 더 많은 영향을 주었을 가능성[1]과, AH8과 nanocomplex를 형성하여 피부 흡수가 용이한 사이즈로 안정화 시켰을[26] 가능성도 배제할 수 없어 추가 연구가 필요하다.

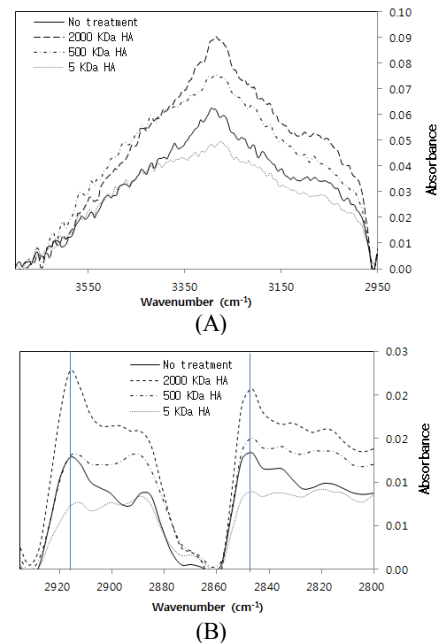


Figure 5. Interaction of HA with human stratum corneum. Changes of SC skin hydration (A) and lipid chain structure (B) after 4 h application of 1% HA on the forearm.

4. 결 론

본 연구에서는 HA가 주름 개선 펩타이드인 AH8의 각질 투과를 촉진하고 피부 진피층으로 흡수를 촉진하는 것을 돼지 피부 모델에서 확인하였다. 또한 인체 피부에 HA를 도포한 후 각질층 구조 변화를 관찰한 결과 HA가 각질 지질층의 유동성을 변화시킬 수 있다는 경향성을 확인하였다. 약물의 피부 흡수 경로는 각질 세포를 통과하는 transcellular route와 각질 세포간 지질을 투과하는 intercellular route가 있는데 지질층 유동성을 증가시키는 것으로 추측되는 저분자량 HA에 많은 영향을 받는 것을 보면 AH8-FITC는 intercellular route를 통해 주로 흡수될 것으로 사료된다. 알코올, azone 등의 intercellular route 흡수 촉진제들은 세포간 지질의 피부 장벽 기능을 훼손할 가능성 있지만 HA는 원래 피부에 존재하는 구성 물질이고 피부 보습 효능이 있어 장벽기능을 저해할 염려가 작다. HA는 AH8의 피부 흡수 촉진뿐만 탄력개선, 보습 효과도 있어 AH8의 주름 개선 효과를 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

Reference

1. M. Witting, A. Boreham, R. Brodewolf, K. Vávrová, U. Alexiev, W. Friess, and S. Hedtrich, Interactions of hyaluronic acid with the skin and implications for the dermal delivery of biomacromolecules, *Mol. Pharm.*, **12**(5), 1391 (2016).
2. C. M. Schoellhammer, D. Blankschtein, and R. Langer, Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **11**(3), 393 (2014).
3. A. Herwadkar and A. K. Banga, Peptide and protein transdermal drug delivery, *Drug Discov. Today Technol.*, **9**(2), e147 (2012).
4. S. H. Lim, Y. Sun, M. T. Thiruvallur, V. Rosa, and L. Kang, Enhanced skin permeation of anti-wrinkle peptides via molecular modification, *Sci. Rep.*, **8**(1), 1596 (2018).
5. C. Blanes-Mira, J. Clemente, G. Jodas, A. Gil, G. Fernández-Ballester, B. Ponsati, L. Gutierrez, E. Pérez-Payá, and A. Ferrer-Montiel, A synthetic hexapeptide (argireline) with antiwrinkle activity, *Int. J. Cosmet Sci.*, **24**(5), 303 (2002).
6. M. P. Lupo and A. L. Cole, Cosmeceutical peptides, *Dermatol. Ther.*, **20**(5), 343 (2007).
7. Y. Wang, M. Wang, S. Xiao, P. Pan, P. Li, and J. Huo, The anti-wrinkle efficacy of argireline, a synthetic hexapeptide, in Chinese subjects: a randomized, placebo-controlled study, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **14**(2), 147 (2013).
8. M. E. Kraeling, W. Zhou, P. Wang, and O. A. Ogunsola, *In vitro* skin penetration of acetyl hexapeptide-8 from a cosmetic formulation, *Cutan. Ocul. Toxicol.*, **34**(1), 46 (2015).
9. M. Hoppel, G. Reznicek, H. Kählig, H. Kotisch, G. P. Resch, and C. Valenta, Topical delivery of acetyl hexapeptide-8 from different emulsions: influence of emulsion composition and internal structure, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **68**, 27 (2015).
10. G. Krishnan, M. S. Roberts, J. Grice, Y. G. Anissimov, H. R. Moghimi, and H. A. Benson, Iontophoretic skin permeation of peptides: an investigation into the influence of molecular properties, iontophoretic conditions and formulation parameter, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **4**(3), 222 (2014).
11. Q. D. Pham, S. Björklund, J. Engblom, D. Topgaard, and E. Sparr, Chemical penetration enhancers in stratum corneum-relation between molecular effects and barrier function, *J. Control Release.*, **232**, 175 (2016).
12. I. B. Pathan and C. M. Setty, Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems, *Trop. J. Pharm. Res.*, **8**(2), 173 (2009).
13. S. Vikas, S. Seema, S. Gurpreet, A. Rana, and J. Baibhav, Penetration enhancers: a novel strategy for enhancing transdermal drug delivery, *Int. Res. J. Pharm.*, **2**(12), 32 (2011).
14. T. X. Xiang and B. D. Anderson, Phase structures of binary lipid bilayers as revealed by permeability of small molecules, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1370**(1), 64 (1998).
15. A. Carruthers and D. L. Melchior, Study of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state, *Biochemistry*, **22**, 5797 (1983).
16. D. T. Downing, Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis, *J. Lipid Res.*, **33**(3), 301 (1992).
17. P. W. Wertz, D. C. Swartzendruber, K. C. Madison, and D. T. Downing, Composition and morphology of epidermal cyst lipids, *J. Invest. Dermatol.*, **89**(4), 419 (1987).
18. S. Björklund, A. Nowacka, J. A. Bouwstra, E. Sparr, and D. Topgaard, Characterization of stratum corneum molecular dynamics by natural-abundance ¹³C solid-state NMR, *PLoS ONE*, **8**(4), e61889 (2013).
19. S. Stahlberg, B. Školová, P. K. Madhu, A. Vogel, K. Vávrová, and D. Huster, Probing the role of the ceramide acyl chain length and sphingosine unsaturation in model skin barrier lipid mixtures by ²H solid-state NMR spectroscopy, *Langmuir*, **31**(17), 4906 (2015).
20. E. H. Mojumdar, Q. D. Pham, D. Topgaard, and E. Sparr, Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum

- corneum, *Sci. Rep.*, **7**, 15712 (2017).
21. S. Björklund, J. M. Andersson, Q. D. Pham, A. Nowacka, D. Topgaard, and E. Sparr, Stratum corneum molecular mobility in the presence of natural moisturizers, *Soft Matter.*, **10**(25), 4535 (2014).
 22. J. Voigt and V. R. Driver, Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Wound Repair Regen.*, **20**(3), 317 (2012).
 23. D. Pirard, P. Vereecken, C. Mélot, and M. Heenen, Three percent diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses: a meta-analysis of the recent studies, *Arch. Dermatol. Res.*, **297**(5), 185 (2005).
 24. J. Meyer, L. Whitcomb, M. Treuheit, and D. Collins, Sustained *in vivo* activity of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rHG-CSF) incorporated into hyaluronan, *J. Controll. Release.*, **35**(1), 67 (1995).
 25. J. A. Yang, E. S. Kim, J. H. Kwon, H. Kim, J. H. Shin, S. H. Yun, K. Y. Choi, and S. K. Hahn, Transdermal delivery of hyaluronic acid-human growth hormone conjugate, *Biomaterials.*, **33**(25), 5947 (2012).
 26. S. J. Na, S. Y. Chae, S. Lee, K. Park, K. Kim, J. H. Park, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and K. C. Lee, Stability and bioactivity of nanocomplex of TNF-related apoptosis-inducing ligand, *Int. J. Pharm.*, **363**(1-2), 149 (2008).
 27. S. H. Lee, S. H. Jun, J. Yeom, S. G. Park, C. K. Lee, and N. G. Kang, Optical clearing agent reduces scattering of light by the stratum corneum and modulates the physical properties of coenocytes via hydration, *Skin Res. Technol.*, **24**(3), 371 (2018).
 28. A. Z. Chen, L. Q. Chen, S. B. Wang, Y. Q. Wang, and J. Z. Zha, Study of magnetic silk fibroin nanoparticles for massage-like transdermal drug delivery, *Int. J. Nanomedicine.*, **10**, 4639 (2015).