

Yeni Nesil Kozmetik Peptid Argireline (Asetil heksapeptid-8) Molekülünün *in vitro* Anti-Tirozinaz, Anti-Kollajenaz, Anti-Elastaz ve Anti Hyalüronidaz Etkilerinin Araştırılması

Investigation of In vitro Anti-Tyrosinase, Anti-Collagenase, Anti-Elastase and Anti-Hyaluronidase Effects of New Generation Cosmetic Peptide Argireline (Acetyl Hexapeptide-8) Molecule

Başak GÖKÇE^{1*} 

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta Türkiye



Ö Z

Bu çalışma, yeni nesil kozmetik peptid argireline molekülünün cilt yaşlanma süreçlerinde yer alan bazı enzim aktiviteleri üzerindeki değişimini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Tirozinaz, kolejenaz, elastaz ve hyalüronidaz enzimleri cilt yaşlanmasında, doğrudan ve terapötik etkileri nedeniyle dikkat çeken enzimlerdir. Yüksek elastaz inhibisyonu kırışıklık önleyici, tirozinaz inhibisyonu beyazlatma etkili, kolejenaz inhibisyonu esneklik ve hyalüronidaz inhibisyonu anti-inflamasyon etkisi göstermektedir. Bu nedenle, son dönemlerde kozmetikte trend olarak kullanılan argireline molekülünün, etkinliği çalışılmıştır. Test edilen genel aktiviteler göz önüne alındığında, argireline bileşiğinin umut verici yaşlanma karşıtı bileşik olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Argireline, tirozinaz, kollajenaz, elastaz, ve hyalüronidaz

Alınış / Received: 21.07.2023 Kabul / Accepted: 27.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

This study was designed to evaluate the alteration of the new generation cosmetic peptide argireline molecule on some enzyme activities involved in skin aging processes. Tyrosinase, collagenase, elastase and hyaluronidase enzymes are the enzymes that attract attention due to their direct and therapeutic effects in skin aging. High elastase inhibition anti-wrinkle, tyrosinase inhibition whitening effect, collagenase inhibition elasticity and hyaluronidase inhibition anti-inflammation effect. For this reason, the effectiveness of the argireline molecule, which has been used as a trend in cosmetics recently, has been studied. Considering the overall activities tested, the argireline compound was judged to be a promising anti-aging compound.

Keywords: Argireline, tyrosinase, collagenase, elastase, and hyaluronidase



1. Giriş

Peptitler, kollajen üretimini uyaran, hücresel süreçleri tetikleme yeteneği vaat eden, kısa amino asit dizili zincirlerdir [1]. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, aktif kozmesötik bileşenler olarak peptitler, yara iyileşmesine ve insan derisi fibroblastlarının büyüme uyarımı üzerine evrildi. Yaşlanan ve deforme olmuş cildin hücresel ve biyokimyasal süreçlerine yönelik ileri araştırmalar, bu süreçleri yavaşlatmak için yeni stratejilere hedeflenmiştir. Hücre büyümesi için anahtar bir enzim olan protein kinaz C'nin aktivasyonu yoluyla, büyüme faktörleri olarak hareket eden peptitler üzerinde mevcut çalışmalar bulunmaktadır [2].

Kollajenaz, elastaz ve hiyalüronidaz cilt yaşlanmasında doğrudan rol oynayan enzimlerdir [3]. Cilt yaşlanması insan vücudunda ilerleyici bir biyolojik süreçtir ve sadece zamana bağlı değildir. Aslında, esas olarak içsel (kronolojik) ve dışsal yaşlanmadan (foto-yaşlanma) kaynaklanmaktadır. Bu ikinci mekanizma, ultraviyole (UV) radyasyonlarının maruz kalmasından ve dış etkenlerden (kirliliğe veya nikotine maruz kalma.. gibi) kaynaklanmaktadır (Şekil 1). Bu yaşlanma süreci, örtü sisteminin farklı bileşenlerinde değişiklikler getirir. Hücre katman sayısı değişirse de epidermis inceler. Kronik UV hasarlı insan derisinde kan damarları da gittikçe azalır. Bu hasarın, elastik liflerin, kollajen liflerin ve hyaluronik asidin degradasyonu ile üst dermal bağ dokusunda belirgin dejeneratif değişiklikler sonucu oluştuğu bilinmektedir. Bunun nedeni muhtemelen, fibroblastlar ve çeşitli inflamatuvar hücrelerde üretilen elastaz, kollajenaz ve hyalüronidaz ekspresyonunun artmasıdır [4].

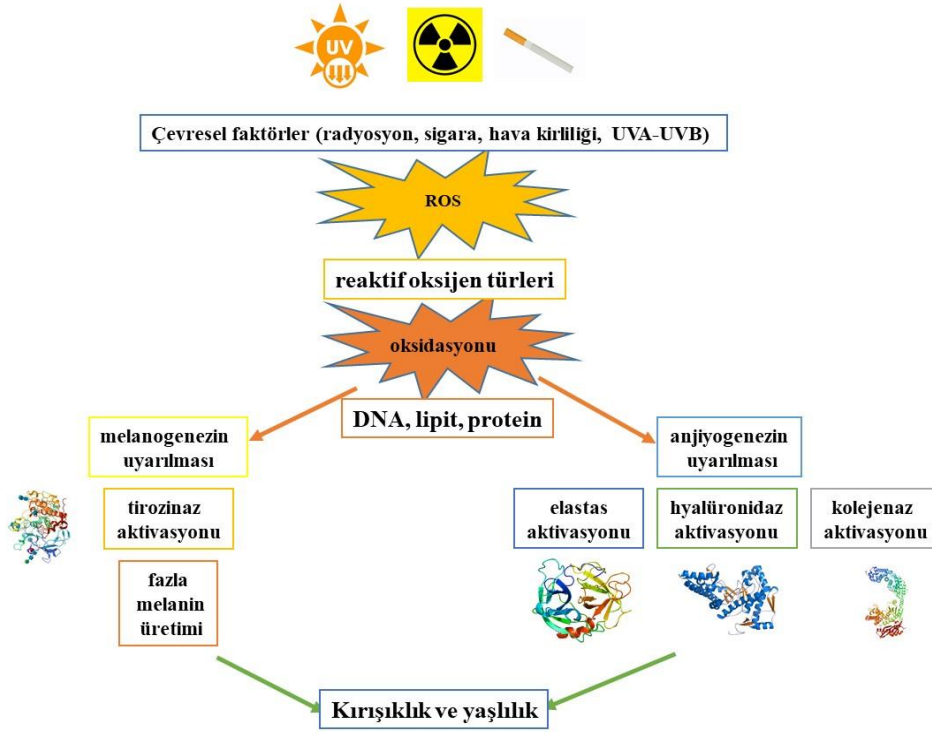
Elastin, deri de dahil olmak üzere bağ dokularında bulunan elastik özelliklere sahip bir proteindir. Gerilme veya geri tepme sonrası doku yapısının korunmasında önemli bir role sahiptir. Birkaç çalışma, cilt yaşlanmasının doğrudan elastinin bozulmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir [5, 6]. UV ışınlarına aşırı maruz kalma ve aşırı ROS üretimi, dermal elastin fiber ağının hidroksilasyonuna neden olan elastaz ekspresyonunu tetikler. Elastaz inhibitörleri, dermal elastik liflerin doğrusallığını ve cilt elastikitesini artırarak kırışıklıkları ve sarkmaları önleyebilir [7].

Hyaluronik asit, kırışıklıkların azalmasında, yaraların iyileşmesinde ve cildin pürüzsüz ve nemli kalmasında önemli bir rol oynar. Hyalüronidaz enzimi, hyaluronik asidin hidrolizini katalize ederek vücut sıvılarının viskozitesini azaltır ve bağ dokularının geçirgenliğini artırır. Bu nedenle hyalüronidaz inhibitörleri, hyaluronik asidin anabolizması ve katabolizması arasındaki dengeyi koruyan, cildi nemli ve pürüzsüz tutan etkili düzenleyici ajanlardır [8].

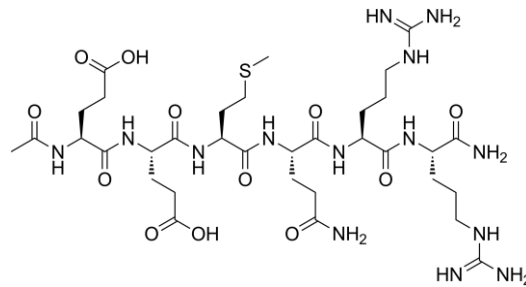
Öte yandan UV güneş ışığı ve reaktif oksijen türleri (ROS), melanin üretim ve dağıtım süreci olan melanogenezi aktive eder (Şekil 1). Melanin pigmentinin varlığı nedeniyle cilt pigmentasyonunda rol

oyunayan anahtar protein olan tirozinaz (tyr) aktive edilir ve hiperpigmentasyon üretilir. Melanin pigmenti içeren melanositlerin sayısı azalır ve boyutu artar. Melanin, cilt renginden sorumlu ana maddedir. UV güneş ışığını %75'e kadar emerek ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyerek cildi korumaktan da sorumludur [9]. Tirozinaz, melanositlerde melanin sentezini katalize etmekten sorumlu bakır içeren bir monooksijenazdır. Cildin anahtar düzenleyici enzimlerinden biridir. Melazma, iltihaplanma sonrası hiperpigmentasyon ve güneş çilleri gibi yüz hiperpigmentasyon bozuklukları, hastaların yaşam kalitesi üzerinde büyük etkisi olabilen ve genellikle tedavisi zor olan sık görülen cilt rahatsızlıklarıdır. Ayrıca cilt yaşlanma bozuklukları ile de ilişkilidirler [10].

Yukarıdaki bilgiler ışığında, insan vücudundaki enzimlerin etkilerini değerlendirme, geniş bir biyolojik kozmetik yelpazesi için yeni terapötikleri anlamak ve bulmak açısından önemlidir. Ticari adı, argireline olarak da bilinen asetil heksapeptid-8, botoks benzeri cilt sıkılaştırma etkileri sayesinde son zamanlarda çok fazla ilgi gören bir peptittir [11]. Ancak botoksun yüksek nörotoksitesisi, kullanımını ciddi şekilde sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, botoksun etkisini taklit eden, toksik olmayan moleküllerin tasarlanmasına ve doğrulanmasına ihtiyaç vardır [12]. Çalışmada; yeni nesil bir peptid olan argireline bileşiğinin (Şekil 2) yukarıda bahsedilen kollajenaz, elastaz, hyaluronidaz ve tirozinaz enzimleri üzerine etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1: Biyolojik enzimlerin yaşlanma ve kırışma sürecine etkileri



Şekil 2: Argireline (Asetil heksapeptid-8) molekülünün kimyasal yapısı

2. Materyal ve Metot

Tirozinaz Enzim Aktivitesi

Tüm saflaştırma basamakları 25°C'de gerçekleştirildi. 50 g muz, hızla ince dilimler halinde kesildi. 100 mL pH 7,3 0.1 M fosfat tamponu, %5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit içeren reaksiyon ortamında 2 dakika blenderda karıştırıldı. Elde edilen homojenat süzöldükten sonra, süzöntü 40 dakika boyunca +4 °C'de 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatana %80 doygunlukta (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi uygulandı. Nihai çökelti, minimum hacimde 5 mM fosfat tamponu içinde çözüldü ve daha sonra aynı tampona karşı diyaliz edildi. Enzim solüsyonu daha sonra, pH 5.0 5 mM fosfat tamponu ile önceden dengelenmiş Sepharose 4B-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolonuna uygulandı [13]. Afinite jeli, muzdan elde edilen tirozinaz enzimi elüe edilmeden önce, 1 M NaCl ve 5 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile yıkandı. Enzim aktivitesi Espin ve ark. yöntemine göre [14], katekol substratı kullanılarak, 420 nm'de absorbans artışı ölçülerek ve 3 kez tekrar edilerek belirlendi. Pozitif standart olarak, kojik asit kullanılmıştır.

Kollajenaz Enzim Aktivitesi

Kollajenaz enzim aktivitesi yöntemi, literatürde bildirilen spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmesiyle, mikropate okuyucuda gerçekleştirilmiştir [15].

Aktivite ölçümü için, 400 mM NaCl ve 10 mM CaCl₂ ile pH 7.5 içeren, aktivite tamponu hazırlanmıştır. Ticari olarak, *Clostridium histolyticum*'dan (ChC - EC.3.4.23.3-Sigma) elde edilen kollajenaz enzimi, 0.8 U/mL başlangıç konsantrasyonunda kullanılmak üzere tampon içinde çözülmüştür. Sentetik substrat N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) aktivite tamponunda 2 mM'a kadar çözülmüştür. Negatif kontroller su ile gerçekleştirilmiştir. 335 nm'deki absorbans, substrat eklendikten hemen sonra ölçülmüştür ve epigallokatekin galat 250 µM (0.114 mg/mL) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Elastaz Enzim Aktivitesi

Elastazın inhibisyonu, enzimin N-succ-(Ala)³-nitroanilid (SANA) substratı ile reaksiyonu sırasında p-nitroanilin üretiminin ölçülmesiyle belirlendi. Deney, domuz pankreas elastazını (3.3 g/mL) içeren Tris-HCl tamponu (0.1 M, pH 8.0) içinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 20 dakika boyunca argireline bileşiği varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. Substrat (1.6 mM) eklendikten sonra enzim aktivitesi 410 nm'de izlendi. Oleanolik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Hiyalüronidaz Enzim Aktivitesi

Hyaluronidazın inhibisyonu, Chompoo ve ark. [16] tarafından bildirilen yöntem ile belirlendi. 77 mM NaCl ve %0.01 sığır serum albümini (BSA) ile 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içeren 100 µL enzim çözeltisi (1.5 U) ile inkübe edildi. 37°C'de 10 dakika sonra, 100 µL substrat çözeltisi (300 mM sodyum fosfat içinde %0.03 hyaluronik asit, pH 5.35) ilave edildi ve reaksiyon karışımı, 45 dakika daha 37°C'de inkübe edildi. Hyaluronik asit, sodyum asetat (24 mM) ve asetik asit (79 mM, pH 3.75) içinde %0.1 BSA içeren 1 mL asit albümin çözeltisi ile çöktüldü. Oda sıcaklığında 10 dakika sonra, absorbans 600 nm'de izlendi. Oleanolik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı.

İstatiksel Analiz

Tüm testler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve değerler ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir.

3. Bulgular

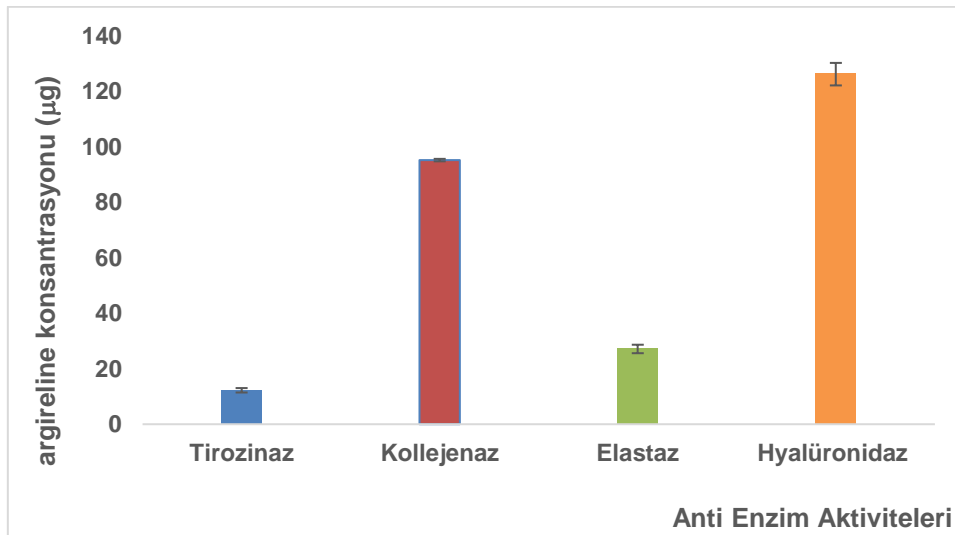
Tirozinaz, Kollajenaz, Elastaz ve Hyalüronidaz Enzimleri Üzerine Argirelinin Etkisi

Bu çalışma ilk kez, literatürde in vivo deneyleri [17] ve faz çalışmaları bulunan [18], ticari olarak yaygın şekilde kozmetik sektöründe kullanılan [19], bir heksapeptid molekülün biyokimyasal süreçleri tetikleyen yaşlılıkla alakalı enzimler üzerine inhibitör aktivitelerini ortaya koymuştur. Sentetik molekül argireline bileşiğinin farklı enzimlere (tirozinaz, elastaz, kollajenaz ve hiyalüronidaz) karşı inhibisyon etkisi incelenmiştir. İnhibisyon profilleri; IC₅₀ değerleri hesaplanarak (Tablo 1) ve kıyaslanmaları sütun grafiği (Şekil 3) şeklinde verilmiştir. Yapılan çalışmada; bileşik tüm enzimleri kuvvetli bir şekilde inhibe etmiştir. En yüksek inhibitör etkisini, tirozinaz enzimine karşı göstermiştir.

Argireline bileşiği yüksek tirozinaz inhibitör aktivitesi (IC_{50} 12.24±0.80 µM) sergilemiştir. Bu sonuç pozitif standart kojik asitten (IC_{50} 17.9 µM) daha düşük bulunmuştur [20]. Kollajenaza karşı argireline bileşiği 95.28±0.45 µM IC_{50} değeri ile, referans bileşik olan epigallokatekin galattan (IC_{50} = 120.8 µM) 1.25 kat daha aktiftir [21]. Argirelin bileşiğinin anti elastaz aktivitesi (IC_{50} = 27.47±1.53 µM), standart inhibitör olan oleanolik asit (IC_{50} = 25.7 µM) [22] değeri ile çok yakın olduğu görülmüştür. Son olarak, hyalüronidaz enzimine karşı argirelin (IC_{50} = 126.78±2.56 µM) pozitif referans olan, oleanolik asitten (IC_{50} = 212.4 µM) [22] yaklaşık 1.5 kat daha etkili olduğu yapılan deneylerle belirlenmiştir.

Tablo 1: Tirozinaz, kollajenaz, elastaz ve hyalüronidaz enzimleri üzerine argirelinin etkisi

	Tirozinaz IC_{50} (µM)	Kollajenaz IC_{50} (µM)	Elastaz IC_{50} (µM)	Hyalüronidaz IC_{50} (µM)
Argireline	12.24±0.80	95.28±0.45	27.47±1.53	126.78±2.56



Şekil 3: Tirozinaz, kollajenaz, elastaz ve hyalüronidaz enzimleri üzerine argirelinin etkisi

4. Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda, tüketicilerin doğal kaynaklardan elde edilen koruyucu ve tedavi edici işlevi olan kozmetik ürünlere olan talebi, bu sektörü alternatif etken madde arayışlarına yöneltmiştir. Biyoaktif peptitler, geniş bir biyoaktivite yelpazesine sahiptir ve bu durum onları bu kozmetik ürünlerin geliştirilmesi için ideal adaylar haline getirmiştir. *In vitro* çalışmalar, biyoaktif peptitlerin elastaz, kollajenaz, tirozinaz ve hyalüronidaz gibi yaşlanma ile ilgili enzimleri inhibe etme özelliklerine ek olarak antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktiviteler dahil biyolojik özellikler sergilediğini göstermiştir [23].

Melanin, cilt renginden sorumlu ana pigmenttir. Bununla birlikte, melanin üretiminden sorumlu olan tirozinazın aşırı üretimi olduğunda, cilt hiperpigmentasyonuna neden olur ve bu da açık ila koyu kahverengi lekeler, yüz, boyun ve gövdede düzensiz gri lekeler ve solgunluk gibi daha koyu bir cilt görünümüne yol açar. Ayrıca cilt hiperpigmentasyonuna neden olan diğer faktörler; otoimmün durumlar, UV radyasyonuna maruz kalma, hormonal değişiklikler, genetik faktörler, hormonal tedavi veya doğum kontrol hapları ve yan etki reaksiyonlarına neden olan ilaçlardır [24]. Tirozinaz, oksidasyon reaksiyonunu katalize etmek için aktif bölgesinde bakır içeren bir enzimdir; bu nedenle, bu enzimi inhibe etmek için aktif bölgeyi bloke eden veya bakır iyonlarını şelatlayan biyoaktif bileşikler kullanılabilir.

Elastin; aort, akciğer, kıkırdak, elastik bağlar ve cilt gibi bağ dokularına esneklik sağlayan hücre dışı bir matris proteindir. Elastin, kollajenden kabaca 1000 kat daha esnektir; bu nedenle elastinin ana işlevi tam olarak dokuların esnekliğidir [25]. Elastin; vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenir ve salgılanır. Bu süreç normalde vücut olgunluğa eriştiğinde ergenlikten hemen sonra durur. Kollajene ek olarak, cildin elastikiyetini ve sıkılığını korumak için elastin üretilir. Bununla birlikte, elastin liflerindeki azalma, elastaz enziminin aşırı üretilmesinden kaynaklanır ve ardından mekanik doku özelliklerini azaltır [26].

Kollajen, insanlarda bulunan en bol proteindir ve dermisin birincil yapısal bileşeni olarak, insan cildine güç ve destek vermenin yanı sıra cilt elastikiyetini ve esnekliğini geri kazandırmaktan sorumludur. En az 16 tip kollajen vardır, vücuttaki kollajenin yaklaşık %90'ı, tekrar eden bir Gly-Pro-X dizisi içeren ve karakteristik bir üçlü sarmal yapıya dönüşen tip I, II ve III'ten oluşur [27]. Normal ciltte, cildin elastikiyetini ve sıkılığını korumak için kollajen tekrar tekrar üretilir ve parçalanır. Bununla birlikte, genel olarak, kollajendeki azalma, matris-metaloproteazların ve kollajenaz enzimlerinin aşırı üretilmesinden kaynaklanır [28].

Hyalüronan olarak da adlandırılan hyaluronik asit, dermisin hücre dışı matrisinin bir biyopolimer bileşenidir ve insan vücudunun birçok dokusunda (örneğin eklem sıvısı, gözler, diş eti, iskelet dokuları ve kalp kapakçıkları) doğal olarak bulunur. Su bağlama kapasitesi nedeniyle ciltte nemin korunması ile ilişkilidir [29], cilt gençleşmesinde önemli bir rol oynar, viskoziteyi artırır ve hücre dışı sıvının geçirgenliğini azaltır [28]. Normal ciltte, cildin nemini korumak için hyaluronik asit üretilir. Ancak hyaluronik asitteki azalma hyalüronidaz enziminin aşırı üretilmesinden kaynaklanır. Şu anda kozmetik endüstrisi topikal uygulama için hyaluronik asit içeren ürünler sunmaktadır, ancak hyaluronik asidin eksojen uygulaması inflamatuvar bir cevaba neden olabilir [29]. Bu nedenle, hyaluronik asit degradasyonunun inhibisyonu, cildi korumak için gereklidir.

Bazı çalışmalar, ciltteki birçok fizyolojik yolu aynı anda faydalı bir şekilde etkileyebilen, çok işlevli biyoaktif peptitleri bildirmektedir. Ayrıca, *in vivo* çalışmalar, biyoaktif peptitlerin topikal uygulamasının veya tüketiminin kayda değer bir cilt korumasına sahip olduğunu ortaya koymuştur [30]. Bu özellikler, koruyucu etkinin altında yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olsa da, biyoaktif peptitlerin spesifik fizyolojik işlevler sağlayarak cilt sağlığının iyileştirilmesine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Cilt yaşlanmasıyla ilgili kozmetik pazarı sürekli olarak güçlü bir büyüme gösteriyor. Bu nedenle, yaşlanmayı ve lekelenmeyi önleyici maddeler üzerine yapılan araştırmalar, popüler araştırma alanlarındadır. Yeni nesil bir heksapeptid olan, argireline bileşiği, tirozinaz, kollajenaz, elastaz ve hyalüronidaz inhibitörleri ile birlikte hareket ederek, cilt yaşlanmasını ve bunun dispigmentasyon, kırışıklık, solgunluk ve çil gibi belirtilerini önleyebilir. Bununla birlikte, faydanın gerçekleşmesi için nihai ürünün formülde stabil olması, cilt tarafından emilmesi ve klinik fayda için hedefte biyolojik olarak aktif olması gerektiğini hatırlamak önemlidir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Ruiz, M. A., Clares, B., Morales, M. E., Cazalla, S., & Gallardo, V. 2007. Preparation and stability of cosmetic formulations with an anti-aging peptide. *Journal of Cosmetic Science*, 58(2), 157-171.
- [2] Schagen, S. K. 2017. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics*, 4(2), 16.
- [3] Lee, K. K., Cho, J. J., Park, E. J., & Choi, J. D. 2001. Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from *Areca catechu* as a new anti-ageing agent. *International Journal of Cosmetic Science*, 23(6), 341-346.
- [4] Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. 2013. Characteristics of the aging skin. *Advances in wound care*, 2(1), 5-10.

- [5] Godinho, M. S., Thorpe, C. T., Greenwald, S. E., & Screen, H. R. 2021. Elastase treatment of tendon specifically impacts the mechanical properties of the interfascicular matrix. *Acta biomaterialia*, 123, 187-196.
- [6] Navneet, S., Brandon, C., Simpson, K., & Rohrer, B. 2023. Exploring the Therapeutic Potential of Elastase Inhibition in Age-Related Macular Degeneration in Mouse and Human. *Cells*, 12(9), 1308.
- [7] Feng, M., Zheng, X., Wan, J., Pan, W., Xie, X., Hu, B., ... & Cai, S. 2021. Research progress on the potential delaying skin aging effect and mechanism of tea for oral and external use. *Food & Function*, 12(7), 2814-2828.
- [8] Hetta, M. 2020. Hyaluronidase inhibitors as skin rejuvenating agents from natural source. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 7(1), 4-4.
- [9] Chiocchio, I., Mandrone, M., Sanna, C., Maxia, A., Tacchini, M., & Poli, F. J. I. C. 2018. Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. *Industrial crops and products*, 122, 498-505.
- [10] Chen, C. Y., Lin, L. C., Yang, W. F., Bordon, J., & D Wang, H. M. 2015. An updated organic classification of tyrosinase inhibitors on melanin biosynthesis. *Current Organic Chemistry*, 19(1), 4-18.
- [11] Kluczyk, A., Ludwiczak, J., Modzel, M., Kuczer, M., Cebrat, M., Biernat, M., & Baçhor, R. 2021. Argireline: Needle-Free Botox as Analytical Challenge. *Chemistry & Biodiversity*, 18(3), e2000992.
- [12] Wang, Y., Wang, M., Xiao, X. S., Huo, J., & Zhang, W. D. 2013. The anti-wrinkle efficacy of Argireline. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 15(4), 237-241.
- [13] Demir, D., Gençer, N., & Er, A. 2012. Purification and characterization of prophenoloxidase from *Galleria mellonella* L. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(6), 391-395.
- [14] Espín, J. C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J., & Garcíacanos, F. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical biochemistry*, 231(1), 237-246.
- [15] Van Wart HE, Steinbrink DR. 1981. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Analytical Biochemistry*, 113:356-365.
- [16] Chompoo, J.; Upadhyay, A.; Fukuta, M.; Tawata, S. 2012. Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. *BMC Complementary Alternative Medicine Journal*. 12, 106
- [17] Gorouhi, F., & Maibach, H. I. 2009. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International journal of cosmetic science*, 31(5), 327-345.
- [18] Wang, Y., Wang, M., Xiao, S., Pan, P., Li, P., & Huo, J. 2013. The anti-wrinkle efficacy of argireline, a synthetic hexapeptide, in Chinese subjects: a randomized, placebo-controlled study. *American journal of clinical dermatology*, 14, 147-153.
- [19] Belsito, M. D., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks Jr, J. G., & Peterson, L. A. 2020. Safety Assessment of Acetyl Hexapeptide-8 and Acetyl Hexapeptide-8 Amide as Used in Cosmetics.
- [20] Cabanes, J., Chazarra, S., & Garcia-Carmona, F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(12), 982-985.
- [21] Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T., & Otake, S. 1993. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *Journal of periodontology*, 64(7), 630-636.
- [22] Facino, R. M., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., & Saibene, L. 1995. Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and saponinins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv der Pharmazie*, 328(10), 720-724.
- [23] Ahsan, F., Arnold, J. J., Meezan, E., & Pillion, D. J. 2003. Sucrose cocoate, a component of cosmetic preparations, enhances nasal and ocular peptide absorption. *International journal of pharmaceutics*, 251(1-2), 195-203.

- [24] Jung, H.J.; Noh, S.G.; Park, Y.; Kang, D.; Chun, P.; Chung, H.Y.; Moon, H.R. 2019. In vitro and in silico insights into tyrosinase inhibitors with (E)-benzylidene-1-indanone derivatives. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 1255–1264.
- [25] Pintus, F., Floris, S., Fais, A., Era, B., Porcedda, C., Tuberoso, C. I. G., & Caddeo, C. 2022. Euphorbia characias Extract: Inhibition of Skin Aging-Related Enzymes and Nanoformulation. *Plants*, 11(14), 1849.
- [26] Widowati, W., Ginting, C. N., Lister, I. N. E., Girsang, E., Amalia, A., Wibowo, S. H. B., & Kusuma, H. S. W. 2020. Anti-aging effects of mangosteen peel extract and its phytochemical compounds: Antioxidant activity, enzyme inhibition and molecular docking simulation. *Tropical Life Sciences Research*, 31(3), 127.
- [27] Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S., & Djadid, N. D. 2016. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 975-981.
- [28] Pham, C. H., Collier, Z. J., Fang, M., Howell, A., & Gillenwater, T. J. 2019. The role of collagenase ointment in acute burns: A systematic review and meta-analysis. *Journal of wound care*, 28(Sup2), S9-S15
- [29] Papaemmanouil, C. D., Peña-García, J., Banegas-Luna, A. J., Kostagianni, A. D., Gerothanassis, I. P., Pérez-Sánchez, H., & Tzakos, A. G. 2022. ANTIAGE-DB: A database and server for the prediction of anti-aging compounds targeting elastase, hyaluronidase, and tyrosinase. *Antioxidants*, 11(11), 2268.
- [30] Mortazavi, S. M., & Moghimi, H. R. 2022. Skin permeability, a dismissed necessity for anti-wrinkle peptide performance. *International Journal of Cosmetic Science*, 44(2), 232-248.