

Određivanje biološkog potencijala frakcija morske makroalge *Cystoseira compressa* baziranog na pigmentima i njihovim derivatima

Begić, Karolina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:232645>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2022.

Karolina Begić

**ODREĐIVANJE BIOLOŠKOG
POTENCIJALA FRAKCIJA
MORSKE MAKROALGE *Cystoseira*
compressa BAZIRANOG NA
PIGMENTIMA I NJIHOVIM
DERIVATIMA**

Rad je izrađen pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivone Elez Garofulić, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu i dr. sc. Sanje Babić, Institut Ruđer Bošković.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi Instituta Ruđer Bošković, u sklopu projekta Znanstvenog Centra Izvrsnosti „Bioprospecting Jadranskog mora“ (BioProCro), financiranog od strane Hrvatske vlade i Europske Unije putem Europskog Fonda za regionalni razvoj - Operativni program konkurentnost i kohezija (KK.01.1.1.01).
Voditeljica projekta: dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac. Rad je izrađen pod voditeljstvom dr. sc. Sanje Babić i doc. dr. sc. Ivone Elez Garofulić.



ZAHVALA

U prvom redu zahvaljujem se svojim mentoricama, dr. sc. Sanji Babić i doc. dr. sc. Ivoni Elez Garofulić koje su mi dale neizmjernu podršku te izdvojile mnogo svog vremena kako bi me savjetovale u svakom dijelu izrade i pisanja rada. Hvala im na izuzetno stručnoj pomoći i korisnim savjetima koji će mi biti od velike koristi za budućnost.

Veliko hvala svim članovima Laboratorija za biotehnologiju u akvakulturi na Zavodu za kemiju materijala pod voditeljstvom dr. sc. Rozelindre Čož-Rakovac na gostoprimstvu i pruženoj prilici.

Veliko hvala mojem Ivanu koji je uvijek bio tu uz mene i trpio me kada mi je bilo teško.

Veliko hvala i mojoj sestri i cimerici Orneli koja je bila uz mene sve ove godine studiranja i uljepšavala svaki dan.

Veliko hvala prijateljicama i prijateljima bez kojih ovaj studentski život ne bi bio takav kakav je bio, nezaboravan.

Veliko hvala bakama i dedi koji su se veselili svakom mom položenom ispitu.

I na kraju, najveću zaslugu za sve što sam postigla mogu pripisati mami i tati, hvala vam što ste uvijek bili tu za mene! Bez vas ovo ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam
Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

Određivanje biološkog potencijala frakcija morske makroalge *Cystoseira compressa* baziranog na pigmentima i njihovim derivatima

Karolina Begić, univ. bacc. nutr.

0058210161

Sažetak: Morske makroalge predstavljaju bogat izvor strukturno različitih i biološki aktivnih molekula. Zbog uravnotežene nutritivne vrijednosti odlični su kandidati za implementaciju u prehrambenu industriju. Unutar ovog rada ispitan je biološki potencijal dviju nepolarnih (metanolna i diklormetanska) frakcija smeđe makroalge *Cystoseira compressa*. Antioksidativna aktivnost utvrđena je pomoću tri *in vitro* metode (ORAC, FRAP i DPPH) te potvrđena *in vivo* pomoću živog embrija zebrice *Danio rerio*. Inhibicija kolagenaze utvrđena je kod obje frakcije, s nešto većim postotkom zabilježenim kod metanolne frakcije. Diklormetanska frakcija potaknula je bržu regeneraciju amputirane repne peraje kod ličinaka zebrice *Danio rerio*, dok kod metanolne frakcije takav učinak nije zabilježen. Testom embriotoksičnosti na embrijima zebrice utvrđene su koncentracije testiranih frakcija bez toksičnog učinka. Usporedbom biološke aktivnosti s rezultatima kemijske analize, može se zaključiti kako su fukoksantin, feoforbid a i feofitini a i b, detektirani u obje ispitivane frakcije, jedni od glavnih spojeva odgovornih za dokazane pozitivne učinke. Dobiveni rezultati pokazuju kako makroalga *Cystoseira compressa* predstavlja prirodan izvor bioaktivnih molekula, posebice pigmenata i njihovih derivata, koje se mogu primijeniti u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Ključne riječi: pigmenti, smeđe makroalge, antioksidativni potencijal, kolagenaza, modelni organizam

Rad sadrži: 49 stranica, 14 slika, 5 tablica, 89 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Komentor: dr. sc. Sanja Babić, znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (mentor)
3. dr. sc. Sanja Babić, znan.sur., IRB (član)
4. doc. dr. sc. Maja Repajić (zamjenski član)

Datum obrane: 22. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition
Graduate university study programme: Nutrition

Determination of biological potential of *Cystoseira compressa* macroalgal fractions based on pigments and their derivatives

Karolina Begić, univ. bacc. nutr.
0058210161

Abstract: Marine macroalgae are a rich source of structurally diverse and biologically active molecules. Due to their balanced nutritional value, they are excellent candidates for implementation in the food industry. Within this work, the biological potential of two non-polar (methanolic and dichloromethane) fractions of brown macroalga *Cystoseira compressa* was examined. Antioxidant activity was determined using three *in vitro* methods (ORAC, FRAP, and DPPH) and confirmed *in vivo* using zebrafish *Danio rerio* embryos. Collagenase inhibition was confirmed on both fractions, with a slightly higher percentage recorded on the methanolic fraction. The dichloromethane fraction stimulated rapid regeneration of the amputated tail fin in *Danio rerio* zebrafish larvae, while no such effect was recorded on the methanolic fraction. The embryotoxicity test on zebrafish embryos determined the concentration of tested fractions with no toxic effects. By comparing the biological activity with the results of the chemical analysis, it can be concluded that fucoxanthin, pheophorbid a and pheophytins a and b, detected in both tested fractions, are one of the main compounds responsible for the proven beneficial effects. The obtained results show that *Cystoseira compressa* represents a natural source of bioactive molecules, especially pigments and their derivatives, that can be used in the food and cosmetic industry.

Keywords: pigments, brown macroalgae, antioxidant potential, collagenase, model organism

Thesis contains: 49 pages, 14 figures, 5 tables, 89 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ivona Elez Garofulić, PhD, Assistant professor

Co-mentor: Sanja Babić, PhD, Research associate, IRB

Reviewers:

1. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (president)
2. Ivona Elez Garofulić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Sanja Babić, PhD, Research associate (mentor)
4. Maja Repajić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 22 September 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE MAKROALGI.....	3
2.2. KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST MAKROALGI	4
2.2.1. Pigmenti.....	5
2.2.2. Polisaharidi	6
2.2.3. Proteini	7
2.2.4. Lipidi	7
2.2.5. Polifenoli.....	8
2.3. <i>Cystoseira compressa</i>	8
2.3. PRIMJENA MAKROALGI U INDUSTRIJI I ZNAČAJ U PREHRANI.....	9
2.4. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE MAKROALGI	10
2.4.1. Oksidativni stres i slobodni radikali.....	10
2.4.2. Antioksidansi i njihova uloga	11
2.5. POZITIVAN UČINAK MAKROALGI NA STARENJE	12
2.6. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ZEBRICA (<i>Danio rerio</i>).....	13
2.6.1. Test embriotoksičnosti na zebricama.....	16
2.6.2. Pozitivan učinak makroalgi na regeneraciju amputirane repne peraje	16
2.6.3. Zakonodavni okviri i načela 3R-a	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. UZORKOVANJE SMEĐE MAKROALGE	18
3.2. KEMIKALIJE	19
Tablica 2. Popis korištenih kemikalija – nastavak.....	20
3.3. UREĐAJI	20
3.4. EKSTRAKCIJA I FRAKCIONIRANJE SPOJEVA OD INTERESA	21
3.5. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i>	21
3.5.1. ORAC metoda	21
3.5.2. DPPH metoda	22
3.5.3. FRAP metoda	22
3.6. ANALIZA INHIBICIJE ENZIMA KOLAGENAZE.....	23
3.7. ODRŽAVANJE ZEBRICA <i>DANIO RERIO</i> I MRIJEST.....	24
3.7.1. Test embriotoksičnosti	25
3.7.2. Ispitivanje antioksidativnog potencijala <i>in vivo</i> upotrebom zebrice.....	27
3.7.3. Ispitivanje regenerativnog potencijala <i>in vivo</i> upotrebom zebrice.....	27
3.8. Statistička obrada podataka.....	28

4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. KEMIJSKA ANALIZA	29
4.2. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL FRAKCIJA MAKROALGE <i>Cystoseira compressa</i>	31
4.3. ANALIZA INHIBICIJE ENZIMA KOLAGENAZE	33
4.4. EMBRIOTOKSIČNOST ISPITIVANIH FRAKCIJA.....	34
4.5. ZAŠTITNI UTJECAJ FRAKCIJA MAKROALGE NA NASTANAK OKSIDATIVNOG STRESA KOD LIČINKI IZLOŽENIH VODIKOVOM PEROKSIDU	36
4.6. REGENERATIVNI POTENCIJAL TESTIRANIH FRAKCIJA ISPITAN <i>IN VIVO</i> UPOTREBOM ZEBRICE .	37
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Morske alge spadaju u gospodarski najperspektivnije organizme na svijetu, čemu svakako doprinosi činjenica da su jedan od najbogatijih izvora funkcionalnih metabolita u morima i oceanima. Alge sadrže mnoge funkcionalne metabolite poput polisaharida, proteina, peptida, aminokiselina, lipida, polifenola, pigmenata i mineralnih soli. Upravo zbog ovakvog kemijskog sastava postaju fokus mnogih istraživanja upravo zbog porasta svijesti o potrebi uvođenja nutritivno-funkcionalnih sastojaka u prehranu (Xu i sur., 2017). Iz nutricionističke perspektive, morske alge imaju vrlo nisku energetska, a visoku nutritivnu vrijednost. Mnoge morske alge se u Aziji intenzivno koriste u jelima poput juha, salata i kao začini. Prehrana bogata morskim algama, pogotovo u azijskim zemljama, povezivala se s nižom incidencijom kroničnih bolesti (npr. karcinom, kardiovaskularne bolesti) (Xu i sur., 2017). Osim što se koriste u prehrani, makroalge se upotrebljavaju i kao hidrokoloide, gnojivo i za stočnu hranu (Jung i sur., 2013).

Veliki utjecaj na strukturu i biološku aktivnost bioaktivnih molekula (proteini, lipidi, polifenoli, pigmenti, polisaharidi, vitamini i minerali) imaju uvjeti staništa koji vrlo često uključuju širok raspon temperature, saliniteta i hidrostatskog tlaka (Jayawardena i sur., 2020). Jadransko more je posebno izazovno stanište zbog visokog saliniteta (35,-38,5 ‰) i relativno male dubine (uglavnom do 200 m dubine), što dovodi do povišenog utjecaja UVA i UVB zračenja te velikih temperaturnih oscilacija (7-27°C) (Grbec i sur., 2018). Zbog promjenjivih i nepovoljnih uvjeta staništa dolazi do pojave oksidativnog stresa što posljedično uzrokuje oštećenja staničnih procesa (Jayawardena i sur., 2020). Morske makroalge razvile su specifične biomolekule koje inhibiraju ili usporavaju reakcije oksidacije te tako smanjuju nastanak potencijalnih slobodnih radikala i pojavu oksidativnog stresa (Jayawardena i sur., 2020). Nadalje, u posljednjih nekoliko desetljeća u morskim algama zabilježen je veliki broj bioaktivnih molekula s iznimnim potencijalom u vidu pozitivnog utjecaja na kožu, što se može očitovati kroz povećanje elastičnosti kože, sprječavanju degradacije kolagena, zacjeljivanje rana i regeneraciju tkiva (Rajapaksha i sur., 2020).

Cilj ovog istraživanja bio je provođenje sveobuhvatnog ispitivanja bioloških aktivnosti (antioksidativne aktivnosti *in vitro* i *in vivo*, inhibitornog utjecaja na kolagenazu te regenerativnog svojstva) frakcija smeđe morske alge *Cystoseira compressa* upotrebom spektrofotometrijskih metoda, kao i uz pomoć modelnog organizma zebrice *Danio rerio*.

Zebrice danas predstavljaju jedne od najperspektivnijih i najučestalije korištenih organizama te se koriste u brojnim biomedicinskim, toksikološkim te farmakološkim istraživanjima. S obzirom na genetsku i fiziološku sličnost između zebrica i ljudi (Yalcin, 2017; Howe, 2013), a time i mogućnost korelacije dobivenih rezultata, ovaj rad predstavlja vrijedna saznanja i prvi korak ka razmatranju mogućnosti implementacije makroalge *Cystoseira compressa* u prehrambene i kozmetičke proizvode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE MAKROALGI

Morske makroalge su višestanični, eukariotski i autotrofni organizmi. Pripadaju nadcarstvima Procaryota i Eucariota. Najveći broj vrsta nalazi se u vodenoj sredini jer su tamo nastale i razvijale se. Međutim, postoje i alge koje su se tokom evolucije prilagodile životu izvan vode (Xu i sur., 2017). Takve alge nastanjuju vlažna i osvijetljena staništa. Taksonomski gledano, dijele se na tri skupine, a to su Chlorophyta (zelene alge), Phaeophyta (smeđe alge) i Rhodophyta (crvene alge) (Leandro i sur., 2019). Razlog takvoj podjeli je boja talusa. Makroalge su osnovni primarni proizvođači organskih tvari u vodi. Također, imaju veliku važnost u prozračivanju vodenih biotopa. Procesom fotosinteze oslobađaju kisik koji je neophodan vodenim organizmima za disanje. Vrlo brzo reagiraju na promjene u okolišu te su dobri indikatori njegova stanja. Sve skupine makroalgi u svojoj unutrašnjosti akumuliraju škrob kao skladište energije. Zelene alge proizvode ulvan te sadrže pigmente poput karotena, ksantofila, klorofila a i klorofila b. Pigmenti prisutni u crvenim makroalgama su klorofil a, klorofil d, karotenoidi te fikoeritrin koji je zaslužan za njihovu boju (Leandro i sur., 2019). U smeđim algama prisutni su fukoksantini, klorofil a, klorofil c i karotenoidi. Uz ove pigmente, sadrže i rezervne tvari, ulja i polisaharide (laminarin).

Morske makroalge su uglavnom sesilni organizmi koji mogu živjeti u ekstremnim i neprijateljskim abiotičkim okolišnim uvjetima poput promjena temperature, salinitet te su izložene UV zračenju. Kako bi preživjele u takvim uvjetima, proizvode niz sekundarnih metabolita poput polisaharida, proteina, peptida, aminokiselina, lipida, polifenola, vitamina, minerala, pigmenta i drugih bioaktivnih tvari (Xu i sur., 2017). Sadržaj makroelemenata je različit, a najviše sadrže ugljikohidrate (do 60 %), zatim slijede proteini (10-47 %) i najmanje sadrže lipide (1-3 %). Što se tiče sadržaja mineralnog pepela, on je promjenjiv te je u rasponu od 7 do 38 % (Dominguez i Loret, 2019). Na kemijski sastav makroalgi značajno utječu uvjeti njihovog staništa (svjetlost, salinitet, temperatura, hranjive tvari, kretanje vode, onečišćenje) (Jung i sur., 2013). Zbog svoje prilagodljivosti i visokog prinosa predstavljaju važan izvor mnogih biološki aktivnih spojeva te se koriste u različitim istraživanjima poput testova toksičnosti, bioremedijaciji (pročišćavanju otpadnih voda), genetičkom inženjerstvu i populacijskoj ekologiji (Dominguez i Loret, 2019). Provedena su brojna istraživanja koja su

pokazala brojne pozitivne učinke na zdravlje kao što su antimikrobno, antioksidativno, protuupalno djelovanje (Stanojković i sur., 2014; Brownlee i sur., 2012).

Smeđe makroalge klasificirane su kao Phaeophyta unutar koljena Chrysophyta. To su višestanični organizmi koji su zastupljeni u umjerenim i hladnijim dijelovima oceana. Razlikuju se čak oko 1500 - 2000 vrsta smeđih algi. Najpoznatiji predstavnici smeđih algi su *Dyctiota dichotoma*, *Padina pavonica*, *Fucus virsoides* te alge iz roda *Cystoseira*. Po obliku mogu biti nitaste, vrpčaste, vrpčasto spljoštene, kožasto lepezaste, dihotomski razgranjene ili raščlanjene. Žive pričvršćene za podlogu, na stijenama i kamenju, a neke alge mogu živjeti na drugim algama kao epifiti (Kadam i sur., 2013). Mogu narasti do duljine oko 45 m, a neke čak i do 100 m. Razmnožavanje može biti vegetativno (fragmentacija talusa), nesporno i spolno (izomorfna ili heteromorfna izmjena generacija). Neke vrste smeđih algi su kritično ugrožene u Jadranskom moru. Endemske vrste u Mediteranu su *Cystoseira zosteroides*, *Cystoseira spinosa* i *Cystoseira funkii* (Hereu i sur., 2008). Najpoznatija smeđa alga u Jadranskom moru je Jadranski bračić (*Fucus virsoides*) koji je također ugrožen. U Jadranu su prisutne i vrste drugih rodova poput *Cystoseira*, *Dictyota*, *Padina* i *Sargassum*. U ovom radu, ispitana je bioaktivnost frakcija smeđe makroalge *Cystoseira compressa*.

2.2. KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST MAKROALGI

Smeđe makroalge sadrže visok sadržaj različitih fitokemikalija i hranjivih tvari koje imaju niz pozitivnih bioaktivnosti (Afonso i sur., 2019). To su polisaharidi, proteini, lipidi, pigmenti, polifenoli, vitamini B skupine, dijetalna vlakna te prirodni spojevi koji djeluju na rast biljnih organa (auksini, giberelini i citokinini) (Michalak i Chojnacka, 2014). Smeđe alge roda *Cystoseira* produciraju mnoge hranjive sastojke poput terpena, sterola i sulfatiranih polisaharida koji imaju veliki utjecaj na zdravlje. Dokazano je da smanjuju kolesterol, reguliraju aktivnost faktora rasta i citokina (Mhadhebia i sur., 2014). Spomenuti metaboliti pokazuju različite biološke aktivnosti poput antioksidativnog, antimikrobnog, antivirusnog, antialergijskog, antikoagulantno i citotoksično djelovanja (Leandro i sur., 2019; Hentati i sur., 2018; Kosanić i sur., 2015). Unazad deset godina brojni radovi istaknuli su antioksidativni potencijal smeđih algi roda *Cystoseira* (Generalić Mekinić i sur., 2021; Hentati i sur., 2018; Kosanić i sur., 2015). Kosanić i sur. (2015) su utvrdili kako je antioksidativno djelovanje u korelaciji s ukupnim sadržajem fenola u ekstraktima algi, koji imaju sposobnost uklanjanja

slobodnih radikala. S druge strane, nisu samo fenoli zaslužni za takvo djelovanje. Tvari koje mogu djelovati kao izvrsni antioksidansi su pigmenti, esencijalna ulja te polisaharidi niske molekulske mase (Kosanić i sur., 2015). Među smeđim makroalgama upravo se rod *Cystoseira* izdvaja kao odličan izvor proteina, ugljikohidrata, vitamina, minerala te drugih nutritivno bogatih tvari. Sadržaj bioaktivnih molekula u makroalgama ovisi o nizu različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika. To su rod i vrsta algi, uvjeti okoliša (temperatura, salinitet, valovi, morske struje, godišnje doba), uvjeti skladištenja i obrada (Catarino i sur., 2018). Uzimajući u obzir navedeno, može se zaključiti da makroalge pružaju neiscrpan izvor brojnih strukturno različitih bioaktivnih molekula s izrazitim potencijalom implementacije u industrijski sektor te su zbog toga pronašle svoju primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Kosanić i sur., 2015).

2.2.1. Pigmenti

Prirodni pigmenti smatraju se potencijalnim zamjenama za sintetska bojila u hrani. Smeđe alge sadrže tri osnovne vrste pigmenata, a to su klorofili, karotenoidi te fikobiloproteini (Pangestuti i Kim, 2011). Karotenoidi se dijele na karotene i ksantofile. Djeluju fotoprotektivno u fotosintetskim organizmima te djeluju antioksidativno, inaktivirajući reaktivne kisikove vrste. Studija iz 2011. dokazala je kako UVB zračenje povećava koncentraciju karotenoida u smeđim algama (Hupel i sur., 2011). Fukoksatin spada u ksantofile te pripada tetraterpenoidima. Ovaj pigment zaslužan je za boju smeđih makroalgi (Afonso i sur., 2019). Koncentracija fukoksantina u makroalgama razlikuje se od vrste do vrste i u ovisnosti je o brojnim vanjskim čimbenicima. *In vivo* studije potvrdile su njegovo antidiijabetičko, antioksidativno djelovanje te djelovanje protiv pretilosti (Mikami i Hosokawa, 2013). Studija iz 2017. dokazala je i antikancerogenu aktivnost fukoksantina uzrokovanu indukcijom apoptoze u tumorskim stanicama (Abu-Ghannam i Shannon, 2017). Iz skupine karotena najzastupljeniji su β -karoten, violaksantin i fukoksantin (Holdt i Kraan, 2011). Fikobiloproteini su fluorescentni proteini topljivi u vodi, a tri glavne vrste su fikocijani, alofikocijani i fikoeritrini koji su najzastupljeniji u crvenim algama (Pangestuti i Kim, 2011).

2.2.2. Polisaharidi

Polisaharidi su ugljikohidrati složene građe i veće molekularne mase, a sastoje se od velikog broja monosaharida povezanih glikozidnom vezom. Predstavljaju glavne komponente kemijskog sastava makroalgi te mogu doseći i do 70 % osušene biomase (Afonso i sur., 2019). Glavni polisaharidi u smeđim algama su fukoidan, laminarin i alginat. Sposobni su apsorbirati veliku količinu vode te tako daju osjećaj sitosti, a pokazuju i blago laksativno djelovanje. Smeđa alga vrste *Fucus vesiculosus* se često koristi kao dodatak prehrani tijekom reduciranog unosa hrane. Najzastupljeniji polisaharid u crvenim algama je karagenan, a u zelenim ulvan. Morske alge predstavljaju najvažniji izvor sulfatiranih polisaharida biljnog porijekla, a kemijska struktura ovih polimera razlikuje se prema rodu i vrsti algi. Polisaharidi, alginat, fukoidan i laminarin su sposobni apsorbirati veliku količinu vode te tako daju osjećaj sitosti, a pokazuju i blago laksativno djelovanje. Smeđa alga vrste *Fucus vesiculosus* se često koristi kao dodatak prehrani tijekom reduciranog unosa hrane.

Alginat je linearni polisaharid sastavljen od β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline. Predstavljaju jedne od najvažnijih koloida u hrani te se stoga koriste kao zgušnjivači, emulgatori, stabilizatori, gelovi s ciljem poboljšanja kvalitete u prehrambenim proizvodima. Alginati pozitivno utječu na zdravlje gastrointestinalnog sustava, regulaciju apetita te su odlični prebiotici. Dokazano je da potiču rast nekoliko bakterija (npr. *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, itd.). S druge pak strane smanjuju koncentraciju štetnih metabolita poput sulfida, fenola, p-krezola, indola i amonijka (Alfonso i sur., 2019). Također, alginati su pronašli primjenu i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Fukoidan je sulfatirani polisaharid koji se uglavnom sastoji od fukoza povezanih povezanih α -(1,3) vezama ili naizmjeničnim α -(1,3) i α -(1,4) vezama. Osim fukoze, sadrži i druge monosaharide poput galaktoze, glukoze, manoze, ksiloze, ramnoze i uronske kiseline (Lim i sur., 2016). Dokazana je njegova antioksidativna, antitumorska, antikoagulantna, antivirusna protuupalna, imunoregulacijska i antitrombotička aktivnost (Wang i sur., 2019). Antioksidativno djelovanje ovisi o glavnom šećeru koji je prisutan, stupnju sulfatiranja, niskoj molekularnoj masi i stereokemiji (Begum i sur., 2021). Osim toga, neka istraživanja su utvrdila specifičnu aktivnost protiv bolesti bubrega, jetre i mokraćnog mjehura (Begam i sur., 2021). *In vivo* studija iz 2004. na štakorima kao modelnom organizmu, dokazala je kako fukoidan ima antihipertenzivni učinak usporediv s učincima lijekova koji se koriste za liječenje hipertenzije (Fu i sur., 2004).

Laminarin je relativno mali polisaharid (5 kDa) koji se sastoji od monomera glukoze vezanih β -(1,3) glikozidnim vezama s tragovima manitola (Alfonso i sur., 2019). Služi kao rezerva hrane u smeđim algama. Bioaktivnost laminarina se vrlo rijetko iskorištava. No, unatoč tome, smatraju se vlaknima te se mogu djelomično ili potpuno fermentirati endogenom crijevnom mikroflorom (Alfonso i sur., 2019). Također, dokazano je njegovo antitumorsko, antibakterijsko i prebiotičko djelovanje (Gupta i Abu-Ghannam, 2011).

2.2.3. Proteini

Makroalge su alternativni izvor proteina. Ne nalaze se u značajnijoj koncentraciji u makroalgama, već se uglavnom nalaze u mikroalgama (npr. Spirulina). Ekstrakcija proteina iz morskih algi je otežana zbog polisaharidnih stijenki. To je potencijalno razlog zašto je ograničena upotreba proteina i peptida iz algi u komercijalne svrhe (Wijesinghe i Jeon, 2011). Najznačajnija skupina proteina u algama su fikobiloproteini koji posjeduju antioksidativno, hepatoprotektivno i protuupalno djelovanje. Uz navedena svojstva, imaju izvanredan nutritivni i farmaceutski potencijal (Michalak i Chojnacka, 2014).

2.2.4. Lipidi

Makroalge predstavljaju dobar izvor lipida. Najviše sadrže višestruko nezasićene masne kiseline poput omega – 3 (eikozapentaenska kiselina-EPA i dokozaheksaenska kiselina-DHA) i omega - 6 masnih kiselina (γ -linolenska kiselina-GLA i arahidonska kiselina-AA) koje pozitivno utječu na rast, razvoj, kognitivne i psihološke funkcije (Mapiye i sur., 2015). Postotak arahidonske kiseline u morskim algama čini vrlo mali udio ukupnih masnih kiselina (Guschina i Harwood, 2006). Vrlo značajna skupina lipida koja je ekstrahirana iz biomase algi su steroli, poput beta-sterola, beta-stigmasterola, fukosterola i kampsterola. Lipidi iz makroalgi se koriste u proizvodnji biodizela (Michalak i Chojnacka, 2014).

2.2.5. Polifenoli

Smeđe makroalge predstavljaju izvanredan izvor polifenola. Polifenoli su velika skupina bioaktivnih fitokemikalija koje se dijele u više grupa, a to su flavonoidi, stilbeni, lignani i fenolne kisline (Fraga i sur., 2019). Polifenoli koji se nalaze u algama su velika skupina sekundarnih metabolita koji se sastoje od oko 8 000 prirodnih spojeva te koji posjeduju brojne pozitivne bioaktivnosti. To su antioksidativno djelovanje te svojstvo uklanjanja slobodnih radikala (Begum i sur., 2021). Za spomenuta djelovanja najzaslužnije su fenolne skupine. Najzastupljeniji fenolni spojevi u smeđim algama su florotanini. Bioaktivni spojevi florotanina su topljivi spojevi ili mogu biti oblici vezani za stanice. Smeđe alge ih proizvode zbog zaštite od biljojeda i različitih stresnih uvjeta te na taj način smanjuju oksidativna oštećenja koja mogu nastati prilikom nedostatka hranjivih tvari i ultraljubičastim zračenjem (Begum i sur., 2021). Razlog tome su visoko hidrofilne komponente i prisutnost hidroksilnih skupina koje stvaraju vodikove veze s vodom. Veličina molekula se kreće između 126 i 650 kDa te se pojavljuju u koncentracijama od 0,5 % do 20 % (Fernando i sur., 2016). Također, djeluju antioksidativno, antimikrobno, citotoksično i antitumorsko (Lomartire i sur., 2021; Abdelhamid i sur., 2018).

2.3. *Cystoseira compressa*

Cystoseira compressa (slika 1) je smeđa makroalga koja pripada redu Fucales te porodici Sargassaceae. Duljina ove makroalge se uglavnom kreće od 15 cm do 30 cm, ali mogu se naći i veće. Grmolika, višegodišnja biljka koja je prisutna na našoj obali tijekom cijele godine. Međutim, ovisno o sezoni može doći do razgradnje grana što dovodi do smanjenja populacije. Ova makroalga može se vrlo brzo prilagoditi različitim ekstremnim uvjetima u moru, a najčešće raste na kamenitim i pješčanim podlogama u plitkim vodama (Hentati i sur., 2018). Makroalge iz roda *Cystoseira* sposobne su proizvoditi različite sekundarne metabolite poput pigmenata, lipida, polisaharida, vitamina, fenolnih spojeva te alginata i fukoidane koji su od visoke biološke važnosti (Hentati i sur., 2018). Vrlo često se koriste u procjeni ekološkog stanja jer su alge iz ovog roda dosta osjetljive na prisutnost stresa u okolišu (Rožić i sur., 2012).

Tablica 1. Znanstvena klasifikacija smeđe makroalge *Cystoseira compressa*

CARSTVO	Eukaryota
KOLJENO	Ochrophyta
RAZRED	Phaeophyceae
RED	Fucales
PORODICA	Sargassaceae
ROD	<i>Cystoseira</i>
VRSTA	<i>Cystoseira compressa</i>



Slika 1. *Cystoseira compressa* (Annonymus 1)

2.3. PRIMJENA MAKROALGI U INDUSTRIJI I ZNAČAJ U PREHRANI

U današnje vrijeme potrošači daju prednost proizvodima prirodnog podrijetla čiji se sastojci ekstrahiraju iz prirodnog izvora (npr. biljke, alge i gljive). Alge predstavljaju izvor različitih bioaktivnih molekula te se iz tog razloga u zapadnim zemljama koriste u industriji lijekova, nutraceutika, funkcionalnoj hrani te u kozmetičkoj industriji. S druge strane, u Aziji su morske makroalge dio tradicionalne prehrane, s najvećim postotkom konzumacije u Japanu. Važno je naglasiti kako imaju značajnu ulogu u makrobiotičkoj prehrani gdje su izvor minerala te zauzimaju gotovo 5 % cjelokupne prehrane. Općenito u prehrani, najzastupljenija je konzumacija smeđih makroalgi (66,5 %). Konzumacija crvenih algi je 33 %, a konzumacija zelenih makroalgi je najmanja te iznosi 5 % (Afonso i sur., 2019).

Nutrijenti prisutni u algama poput polisaharida, proteina, pigmenta, aminokiselina i fenolnih spojeva pomažu kod održavanja zdravlja i prevenciji nekih kroničnih bolesti. Pigmenti koji se prirodno nalaze u morskim makroalgama predstavljaju odličan izvor aktivnih sastojaka te imaju prednost nad drugim izvorima biološki aktivnih spojeva. Razlog tome je visoki prinosi ekstrakcije, dostupnost biomase te jeftin, jednostavan i ekološki prihvatljiv način proizvodnje (Michalak i Chojnacka, 2014). Jedna od najinovativnijih regija zbog korištenja morskih

makroalgi kao sastojka hrane u novim proizvodima jest Europa (Afonso i sur., 2019). Industrijski gledano, najznačajniji spojevi prisutni u algama su polisaharidi. U smeđim algama je to alginat, ali važni su i karagenani i agar koji se koriste kao tvari za zgrušnjavanje, želiranje ili kao emulgatori. Vitamini koji se nalaze u algama su vitamini A, B1, B3, B5, B6, B9, B12, C, D, E, K te niacin i folna kiselina. Vitamin D pronađen je u smeđim algama, a količina vitamina C varira od 3 do 135 mg/100 g svježih algi (Dominguez i Loret, 2019). Minerali su također prisutni u algama, a to su natrij, kalcij, klor, sulfati i fosfati te mikroelementi jod, bakar, željezo, cink, selen, molibden, fluor, mangan, bor, nikal i kobalt (Dominguez i Loret, 2019).

Također, teži se ka povećanoj upotrebi algi za komercijalnu proizvodnju polinezasićenih masnih kiselina. Strategije koje bi dovele do cilja su daljnja selekcija i probir uljastih vrsta, optimizacija uvjeta uzgoja i razvoj učinkovitih sustava uzgoja te poboljšanje sojeva genetskom manipulacijom (Guschina i Harwood, 2006). Bioaktivne tvari algi se mogu potencijalno koristiti kao izvor ekoloških pesticida, agrokemijskih spojeva, lijekova i kozmetičkih proizvoda (Gouveia i sur., 2013).

Alge se koriste i u svrhu liječenja kožnih bolesti (npr. atopijski dermatitis) (Thiyagarasaiyar i sur., 2020). Dokazano je kako su smeđe alge najviše pridonijele razvoju kozmetičkih proizvoda. Ekstrakti se koriste u proizvodima za čišćenje lica, toniranje i hidrataciju kože, kremama za zaštitu od UV zračenja, proizvodima za pomlađivanje kože (Thiyagarasaiyar i sur., 2020). Također, mogu djelovati protuupalno, anticelulitno te poticati obnovu oštećenih stanica kože i povećati elastičnost i gipkost istih (Mohapatra i sur., 2013).

2.4. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE MAKROALGI

2.4.1. Oksidativni stres i slobodni radikali

Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između proizvodnje oksidansa i antioksidansa što dovodi do različitih oštećenja bioloških sustava (Forman i Zhang, 2021). Svaka kemijska vrsta koja u vanjskoj ljusci posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona su slobodni radikali. Slobodni radikali su vrlo reaktivna vrsta zbog svojeg nesparenog elektrona. U aerobnim živim organizmima nastaju kontinuirano pod utjecajem endogenog metabolizma, upala, infekcija, karcinoma, ishemije ili egzogenih izvora poput ionizirajućeg zračenja, UV-zračenja, lijekova, kancerogenih spojeva, zagađenog zraka, radioaktivnog otpada (Dizdaroglu i Jaruga, 2012).

Dokazano je kako oksidativni stres utječe na razvoj određenih bolesti poput ateroskleroze, Alzheimerove bolesti, karcinoma i opstruktivne plućne bolesti (Forman i Zhang, 2021). Razlikujemo dva glavna mehanizma djelovanja oksidativnog stresa na nastanak oštećenja i razvoj bolesti. Prvi mehanizam uključuje stvaranje reaktivnih vrsta. Reaktivne kisikove vrste (ROS) imaju presudnu ulogu u fiziološkim i patofiziološkim procesima (Briegera i sur., 2012). Reaktivne kisikove vrste mogu biti neutralne molekule poput vodikovog peroksida (H_2O_2), ioni poput superoksidnog aniona (O_2^-) ili radikali poput hidroksilnog radikala (OH^\bullet). Dijele se na slobodne radikale i aktivne neradikalne derivate kisika. U slobodne radikale spadaju superoksid-radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil-radikal (OH^\bullet) i peroksil-radikal (ROO^\bullet). U aktivne neradikalne derivate kisika spadaju vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina ($HOCl$) i singletni kisik (O_2). Reaktivne kisikove vrste direktno oksidiraju makromolekule poput strukturnih proteina, lipida, enzima, nukleinskih kiselina. Posljedica oksidacije je aberantna funkcija stanica i apoptoza (Forman i Zhang, 2021). Drugi mehanizam djelovanja oksidativnog stresa jest aberantna redoks signalizacija (Forman i Zhang, 2021). Određeni oksidansi koji nastaju nakon fiziološke stimulacije mogu djelovati kao drugi glasnici (npr. vodikov peroksid). Nefiziološka proizvodnja vodikovog peroksida posljedično može dovesti do pogrešne redoks signalizacije. Oksidativni stres može biti primarni uzrok patologije bolesti ili može predstavljati sekundarni doprinos samoj progresiji bolesti (Forman i Zhang, 2021). Oksidativni stres može biti povezan i s neurodegenerativnim bolestima, procesima starenja i procesima starenja kože (Wang i sur., 2019; Pangestuti i sur., 2018).

2.4.2. Antioksidansi i njihova uloga

Antioksidans je svaka stabilna tvar koja može donirati elektrone ili vodik slobodnim radikalima što dovodi do neutralizacije i sprječava nastanak oštećenja stanične strukture uzrokovanog oksidacijom (Shahreza, 2016). Mogu djelovati izravno ili neizravno sa slobodnim radikalima. Izravno djelovanje uključuje izravnu reakciju s prooksidansima te dolazi do popravka ili sprječavanja štete uzrokovane slobodnim radikalima. Neizravno djelovanje podrazumijeva regeneraciju i zaštitu od oksidiranih antioksidansa (Shahreza, 2016). Antioksidansi inhibiraju prooksidativne enzime, djeluju sinergistički s drugim antioksidansima, hvataju singletni kisik, prekidaju propagaciju autooksidativnih lančanih reakcija, usporavaju reakcije oksidacije slobodnih radikala te inhibiraju stvaranje slobodnih lipidnih radikala (Briegera i sur., 2012). Veliki broj antioksidanasa nalazi se u povrću, voću, mesu, dodacima

prehrani te ribi. To su vitamin C, vitamin E, vitamin A, beta-karoten, likopen, lutein, selen, mangan, zeaksantin, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi, askorbinska kiselina i polifenoli (Shahreza, 2016). Navedeni antioksidansi imaju različite funkcije, ali često djeluju sinergistički. Mnoge epidemiološke studije upućuju na povezanost prehrane bogate antioksidansima s nižom stopom razvoja bolesti povezane s nastankom slobodnih radikala (Briegera i sur., 2012). Antioksidativna aktivnost kod makroalgi povezana je s kemijskim sastavom te se očituje kroz sinergistički učinak bioloških aktivnih komponenata. Neki od spojeva za koje se smatra da su odgovorni za antioksidativno djelovanje su aminokiseline povezane s mikosporinom, fenolni spojevi (npr. florotanini, cimetna kiselina), sulfatirani polisaharidi te karotenoidi (Dominguez, 2013).

2.5. POZITIVAN UČINAK MAKROALGI NA STARENJE

Starenje kože predstavlja složen biološki proces na koji utječe kombinacija unutarnjih i vanjskih čimbenika (Zouboulis i sur., 2019). Koža je prvi očiti dokaz procesa starenja, a očituje se nastankom bora, neujednačenog tona, gubitka elastičnosti i stanjivanja (Zouboulis i sur., 2019). Starenje kože dijeli se na egzogeno starenje i endogeno starenje. Endogeno starenje se odražava u procesima razgradnje cijelog organizma te je uzrokovano smanjenjem elastičnosti kože kroz vrijeme. Na egzogeno starenje utječe kronična izloženost svjetlu, zagađenje, ionizirajuće zračenje, toksini i različite kemikalije. Dolazi do promjena koje nastaju u vezivnom tkivu zbog stvaranja lipidnih peroksida, enzima i reaktivnih kisikovih vrsta (Thring i sur., 2009). Postoje tri primarne strukturne komponente kože koje su povezane sa starenjem. To su kolagen, elastin i glikozaminoglikani (Reshma i sur., 2022). Kolagen je odgovoran za čvrstoću kože te čini 80 % težine suhe kože. Elastin daje elastičnost koži te tvori mreže elastinskih vlakna (2-4 %). Za hidrataciju kože zaslužni su glikozaminoglikani (Thring i sur., 2009).

Kolagenaze su metaloproteinaze koje razlažu peptidne veze kolagena (Zouboulis i sur., 2019). Cijepaju X-Gly vezu kolagena i peptida koji imaju redosljed -Pro-X-Gly-Pro. X predstavlja bilo koju aminokiselinu (Thring i sur., 2009). Elastaza je proteaza koja je odgovorna za razgradnju elastina. Elastin je od vitalnog značaja jer daje elastičnost arterijama, plućima te ligamentima kože (Baylac i Racine, 2004). Prema tome, važno je pronaći potencijalne inhibitore kolagenaze i elastaze kako bi se spriječio gubitak čvrstoće i elastičnosti kože.

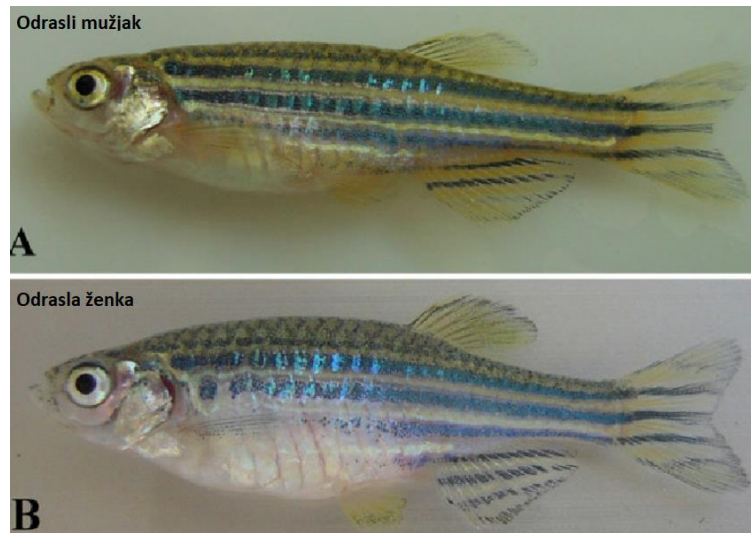
Postoje dvije glavne skupine spojeva koji se mogu koristiti kao sastojci u proizvodima protiv starenja. To su antioksidansi i stanični regulatori. Provedena su mnoga istraživanja koja su dokazala da sekundarni metaboliti i cjeloviti ekstrakti iz biljaka djeluju kao antioksidansi te imaju djelovanje protiv kolagenaze i elastaze. To su spojevi poput polifenola (flavonoidi, tokoferoli, tanini, fenolne kiseline). Dokazano je kako su polifenoli katehin i epigalokatehin galat, izolirani iz zelenog čaja, inhibitori kolagenaze i elastaze (Elmets i sur., 2001). Uz polifenole, vrlo važni antioksidansi su i vitamini (vitamin C, vitamin E i vitamin B3). Ovi spojevi smanjuju razgradnju kolagena smanjenjem koncentracije slobodnih radikala u tkivima (Zouboulis i sur., 2019). Stanični regulatori su retinoli, hormoni i peptidi koji direktno djeluju na metabolizam kolagena te stimuliraju proizvodnju kolagena i elastina (Zouboulis i sur., 2019).

Alge imaju primjenu u kozmetičkoj industriji zbog kemijskog sastava koji uključuje polisaharide, masne kiseline, esencijalne aminokiseline, antioksidanse te vitamine. Njihova upotreba u kozmetičkim proizvodima raste zbog potencijalnog pozitivnog učinka na starenje kože, tamnjenje te pojavu pigmentacije. Pojedini spojevi izolirani iz algi pokazali su inhibitorski utjecaj na kolagenazu, elastazu i hijaluronidazu, što u konačnici rezultira sa ljepšom i zdravijom kožom (Fayad i sur., 2018).

2.6. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ZEBRICA (*Danio rerio*)

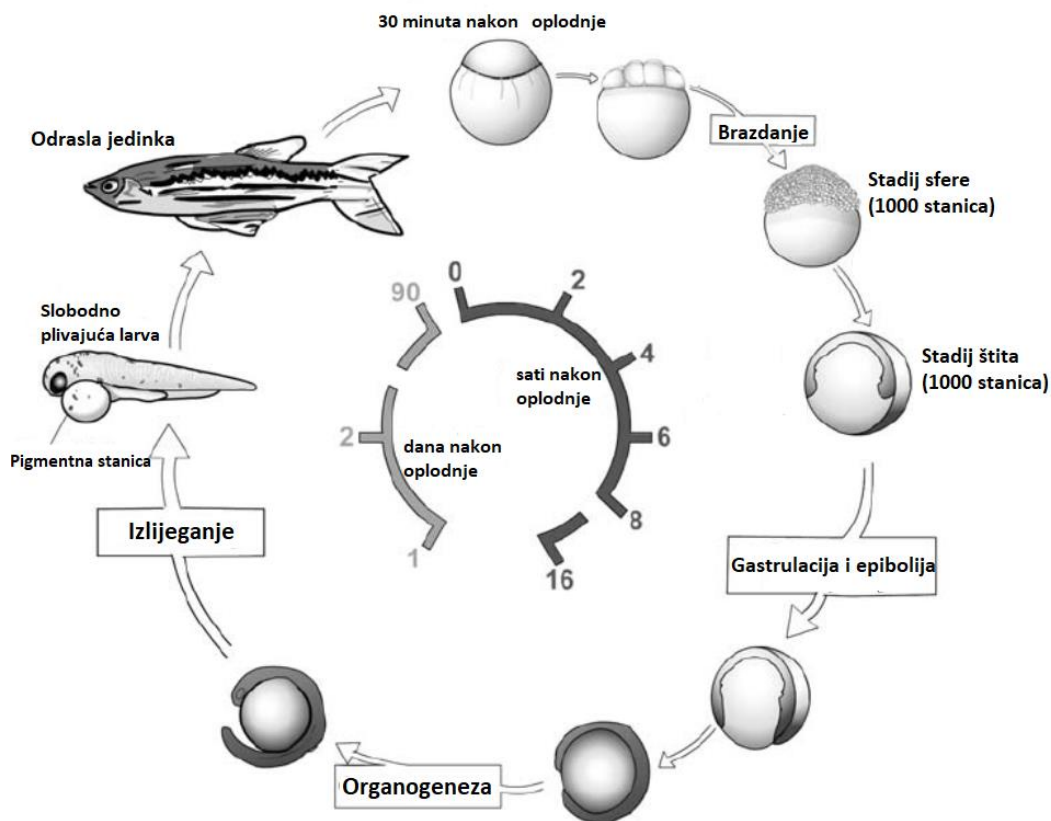
Zebrica (*Danio rerio*) je slatkovodna riba koja pripada obitelji Cyprinidae, a potječe iz Indije (Ribas i Piferrer, 2013). Najčešće se nalaze u vodama Nepala, Bangladeša, Pakistana i Myanmara (Parichy, 2015). Zebrice su egzotermne životinje te se unutar laboratorija uzgajaju unutar temperaturnog raspona od 27 - 28 °C, a u divljini naseljavaju različita staništa od 18 °C do preko 38 °C (Spence i sur., 2007). Mogu živjeti u vodama različite kiselosti gdje se pH može kretati od 5,5 do 9. Težina odrasle jedinke u laboratorijskim uvjetima iznosi od 0,5 do 0,9 g, dok je duljina od 22 do 38 mm (Ribas i Piferrer, 2013). Prosječni životni vijek u divljini im je oko 2-3 godine, dok u zatočeništvu žive oko 4 godine (Gerrhard i sur., 2002). Zebrica je svoje ime dobila zbog 4 vodoravne pruge tamnije sive boje koje se protežu od škržnih poklopaca pa sve do repa (slika 2). Kod odraslih jedinki prisutan je spolni dimorfizam. Ženke su veće te ih karakterizira bijeli, zaobljeni trbuh. Mužjaci su manji te imaju izduljenije tijelo, žućkaste boje (Kossack i Draper, 2019). Razlog zašto mužjaci imaju žutu boju jest zbog ksantofora. Ksantofori su pigmentne stanice. Uz ksantofore, ribe zebrice imaju crne pruge koje tvore

melanofori (Kossack i Draper, 2019). Njihovo ubrzano kretanje omogućuju parna prsna i neparna dorzalna peraja postavljene su posteriorno. Ribe zebrice su brze, živahne te lake za uzgoj i razmnožavanje. Hrana su im zooplanktoni, mali insekti, alge te druge biljne vrste.



Slika 2. *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (prema Avdesh i sur., 2012)

Par zebrica može dati od 100 do 400 embrija po mrijestu. Postoji sedam stadija embrionalnog razvoja ribe zebrice, a to su stadij zigote, stadij dioba, stadij blastule, stadij gastrule, stadij segmentacije, stadij faringule i stadij izleganja (Slika 3). Prva dioba kreće oko 40. minute nakon oplodnje (Issac i sur., 2021). Uvid u razvoj organa moguć je iz razloga što je jedinka transparentna kroz cijeli embrionalni razvoj (Kimmel i sur., 1995). Embrionalni razvoj zebrice traje svega 72 h, kada dolazi do izvaljivanja tj. ličinka napušta korion (Kimmel i sur., 1995). Nakon 120 h od oplodnje, ličinka se počinje samostalno hraniti.



Slika 3. Razvojni ciklus ribe zebrice *Danio rerio* (prema D'Costa i Shepherd, 2009)

Zebrice su se pokazale kao izvrsni modelni organizam u mnogim istraživačkim područjima, a najviše u području razvojne biologije, toksikologije i genetike. Također, zebrice su se pokazale kao dobar modelni organizam na području onkologije, regenerativne medicine i neurobiologije (Hill i sur., 2005). Ovaj modelni organizam odlikuje kratko vrijeme generacije (2-3 mjeseca), laka manipulacija i održavanje, *ex utero* razvoj, jednostavan i ekonomičan uzgoj, laka podložnost genskoj manipulaciji (Ribas i Piferrer, 2013). Vrlo važna karakteristika jest podudaranje čak 70 % gena riba zebrica s genima čovjeka. Štoviše, više od 84 % gena koji uzrokuju genetske bolesti kod ljudi prisutno je u zebricama, što je otvorilo vrata brojnim biomedicinskim istraživanjima (Choi i sur., 2021). Imaju sposobnost regeneracije kože, peraja, mozga i srca tijekom svojih ličinačkih stadija (Nusslein-Volhard i sur., 2002). Zebrice se koriste u istraživanjima vezanim uz kardiovaskularne bolesti jer imaju zatvoreni kardiovaskularni sustav te je sam srčani ciklus vrlo sličan kardiovaskularnoj fiziologiji čovjeka. Također se koriste u istraživanjima koja su povezana s aterosklerozom, aritmijama i kardiomiopatijom (Shafik i Cifuentes, 2018).

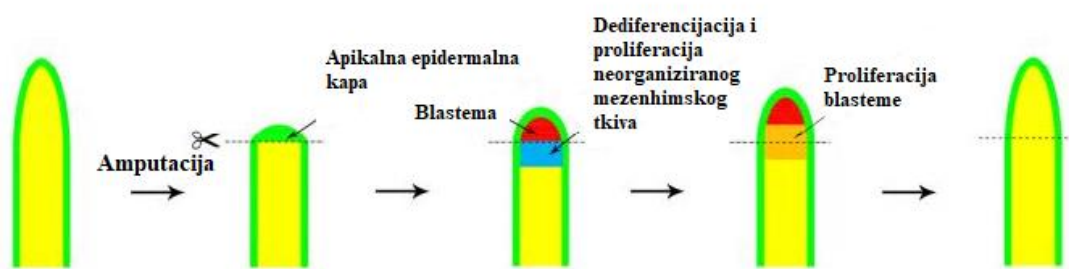
2.6.1. Test embriotoksičnosti na zebricama

Test embriotoksičnosti (eng. *Zebrafish Embryotoxicity Test*, ZET; OECD 236, 2013) zamišljen kao alternativa za test akutne toksičnosti na odraslim jedinkama. Taj test je optimiziran, standardiziran i validiran te se kao takav koristi za procjenu toksičnosti na embrionalnim i ranim ličinačkim stadijima zebriće (Braunbeck i sur., 2014). Tijekom trajanja testa prate se letalni i subletalni učinci testiranog uzorka. Letalni učinci obuhvaćaju prestanak rada srca, koagulaciju embrija, neodvajanje repa od žumanjčane vrećice te neformiranje somita. U subletalne učinke spada skolioza, usporenost razvoja, nastanak perikardijalnog edema ili edema u području žumanjčane vrećice (Zhu i sur., 2018; OECD 236, 2013). Također, tijekom trajanja testa mogu se pratiti razni krajnji učinci, poput razine oksidativnog stresa, kardiotoksičnosti, neurotoksičnosti, itd. (Babić i sur., 2021). Spojevi čija je molekulska masa veća od 3 kDa ne mogu proći korion te ga je potrebno mehanički ukloniti (Braunbeck i sur., 2014). Brojni znanstveni radovi dokazali su korisnost upotrebe embrija zebriće *Danio rerio* u svrhu ispitivanja različitih bioaktivnosti spojeva izoliranih iz morskih organizama (Braunbeck i sur., 2014).

2.6.2. Pozitivan učinak makroalgi na regeneraciju amputirane repne peraje

Regeneracija je obnavljanje dijelova organa ili tkiva određenog organizma koji su se istrošili, izgubili ili ozljedom uništili. Stupanj regeneracije kod životinja je vrlo raznolik. Uglavnom organizmi nižeg filogenetskog stupnja imaju veću sposobnost regeneracije. Kod riba zebrića postoji mogućnost regeneracije mnogih organa poput peraje, srca, središnjeg živčanog sustava, jetre, gušterače, bubrega i kostiju (Shi i sur., 2015). U ovom radu je ispitana regeneracija repne peraje unutar 48 sati nakon amputacije. Razlog zašto se repna peraja intenzivno istražuje jest njena jednostavna struktura, nedostaju određena tkiva poput mišića i hrskavice, laki su vanjski zahvati te brza regeneracija (Shi i sur., 2015). U odraslih zebrića, repna peraja se može potpuno regenerirati unutar 2-3 tjedna. Kod ličinaka je moguća potpuna regeneracija unutar samo 3 dana (Tal i sur., 2010). Proces regeneracije podijeljen je u četiri faze (slika 4). Prva faza se inicira odmah nakon ozljede te uključuje zacjeljivanje rane. Apikalna epidermalna kapa je najvažnija struktura važna za formiranje blasteme. Blastema je osnovna stanična organizacija važna za poticanje i početak regeneracije repne peraje. Sastoji se od morfološki sličnih stanica koja se formira kroz distalnu migraciju fibroblasta i osteoblasta (Gemberling i sur., 2013). Apikalna epidermalna kapa se brzo formira migracijom

neproliferativnih lateralnih epitelnih stanica preko rane (Shi i sur., 2015). U drugoj fazi dolazi do formacije blasteme na način da se neorganizirane mezenhimalne stanice koje se nalaze ispod apikalne epidermalne kape dediferenciraju i proliferiraju. Glavni pokazatelj regeneracije je nastanak blasteme. Ona se dalje može podijeliti na proksimalnu i distalnu blastemu. Treća faza je faza u kojoj dolazi do ekstenzivne proliferacije stanica proksimalne blasteme. Četvrta faza počinje kada novonastala peraja naraste do izvorne dužine, no mehanizmi koji pokreću fazu terminacije regeneracije još uvijek nisu poznati (Shi i sur., 2015). Novija istraživanja pokazuju da izvor inicijacije regeneracije mogu biti obližnji osteoblasti.



Slika 4. Prikaz procesa regeneracije amputirane repne peraje (prema Shi i sur., 2015)

2.6.3. Zakonodavni okviri i načela 3R-a

Načelo 3R temelji se na sljedećem principu: zamjenjivanja životinja s drugim prihvatljivijim modelnim organizmima (engl. *Replacement*), smanjivanja broja jedinki korištenih u pokusima (engl. *Reduction*) i poboljšanja metoda u svrhu dobrobiti životinja (engl. *Refinement*) (Russell i Burch, 1959). Kada su u pitanju embriji zebrića u potpunosti se zadovoljavaju ova načela. S obzirom na dostupnost velikog broja transgeničnih i mutantnih linija zebrića, u posljednja dva desetljeća ovaj je modelni organizam postao sve učestalije korišteni zamjenski model viših kralježnjaka. Zebriće do 120 sati nakon oplodnje (engl. *hours post fertilization; hpf*), kada počinju samostalno plivanje i hranjenje, ne podliježu zakonskoj regulativi (Direktiva EU, 2010/63/EU), čime se smanjuje patnja velikog broja odraslih jedinki (ponajviše sisavaca) u znanstvenim eksperimentima. S obzirom da je zebrića transparentna tijekom cijelog embrionalnog razvoja, znanstvenicima je omogućen uvid u razvoj organa korištenjem ne-invazivnih ili manje invazivnih metoda.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZORKOVANJE SMEĐE MAKROALGE

U svrhu ovog istraživanja uzorkovana je smeđa makroalga *Cystoseira compressa*. Lokacija uzorkovanja su Kolovare (44°06'26"N, 15°13'54"E). Uzorkovanje biomase obavljeno je od strane licenciranog ronioca i inženjera biologije Donata Petricioli. Prikupljeni uzorak pohranjen je u prijenosni hladnjak zbog očuvanja svoje biološke aktivnosti te transportiran u laboratorij na daljnju obradu. Po zaprimanju u laboratorij, makroalga je temeljito isprana destiliranom vodom kako bi se uklonila morska sol i nečistoće. Nakon toga slijedila je liofilizacija kroz 24 h koristeći Martin Christ Alpha 2-4 LSCplus liofilizator (Osterode, Njemačka) (slika 5). Nakon liofilizacije, biomasa je usitnjena u tarioniku.



Slika 5. a) Alga *Cystoseira compressa* unutar liofilizatora (lijevo) i b) Martin Christ Alpha 2-4 LSCplus liofilizator (desno) (vlastita fotografija)

3.2. KEMIKALIJE

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

Ime (kratica)	Kemijska formula	Proizvođač (registarski broj)
Metanol	CH ₃ OH	LabExpert, Ljubljana, Slovenija (CAS 67-56-1)
Dimetil sulfoksid (DMSO)	(CH ₃) ₂ SO	Kemika, Zagreb, Hrvatska (CAS 67-68-5)
Vodikov peroksid	H ₂ O ₂	Alkaloid, Skopje, Makedonija (CAS 7722-84-1)
2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCF-DA)	C ₂₄ H ₁₆ Cl ₂ O ₇	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 4091-99-0)
Etil 3-aminobenzoat metansulfonat (MS-222)	C ₉ H ₁₁ NO ₂ × CH ₄ SO ₃	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 886-86-2)
Kalcij klorid dihidrat	CaCl ₂ × 2H ₂ O	Emsure, Darmstadt, Njemačka (CAS 10035- 04-8)
Magnezij sulfat	MgSO ₄ × 7H ₂ O	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska (CAS 10034-99- 8)
Natrijev hidrogenkarbonat	NaHCO ₃	Kemika, Zagreb, Hrvatska (CAS 144-55-8)
Kalij klorid	KCl	Kemika, Zagreb, Hrvatska (CAS 7447-40-7)
Sumporna kiselina	HCl	Fisher Chemical, SAD (CAS 7664-93-9)
Kalij sulfat	K ₂ SO ₄	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska (CAS 7778-80-5)
Natrij acetat	C ₂ H ₃ NaO ₂	
Octena kiselina	CH ₃ COOH	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 64-19-7)
Željezo (III) klorid	FeCl ₃	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 7705-08-0)
Natrijev hidrogen fosfat dihidrat	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 10028-24-7)
Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat	NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 10028-24-7)
2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 1898-66-4)

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija – nastavak

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	$[=NC(CH_3)_2C(=NH)N$ $H_2]_2 \times 2HCl$	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 2997-92-4)
Askorbinska kiselina	$C_6H_8O_6$	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 50-81-7)
Kit za kolorimetrijsku analizu aktivnosti kolagenaze	-	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (Cat. No. MAK293)
CM-H2DCFDA	-	Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon (CAS 4091-99-0)

3.3. UREĐAJI

Tablica 3. Popis korištenih instrumenata

Naziv instrumenta	Model i proizvođač
Liofilizator	Martin Christ Alpha 2-4 LSCplus, Osterode, Njemačka
Invertni mikroskop	CKX41, s pripadajućom digitalnom kamerom Leica EC3 i LAS EZ 3.2.0 softverom za analizu slike, Olympus, Njemačka
Fluorescentni svjetlosni mikroskop	BX51 s digitalnom kamerom DP70 i Microsoft® AnalySISSoft Imaging System Software-om, Olympus, Njemačka
Stereomikroskop	S6E, Leica stereomicroscope, Njemačka
Spektrofotometar	Infinite M200, PRO, TECAN, Švicarska
Inkubator	TIN-IN35, Phoenix, Garbsen, Njemačka
Ultrazvučna kupelj	Sonorex digiplus, Bandelin, Njemačka
ZebTEC samoregulirajući sustav za uzgoj zebrića s Active Blue tehnologijom	Tecniplast S.p.A., Italija
Mrijestilica	iSpawn-S Benchttop Size Breeding System, Tecniplast S.p.A., Italija

3.4. EKSTRAKCIJA I FRAKCIONIRANJE SPOJEVA OD INTERESA

Odmah po zaprimanju makroalga je liofilizirana (liofilizator Martin Christ Alpha 2-4 LSCplus) u uvjetima visokog vakuuma (0,13-0,55 hPa) u periodu od 48 h, usitnjena te je izvagana masa od otprilike 5 g. Ekstrakcija je izvršena u ultrazvučnoj kupelji (Sonorex digiplus, Bandelin, Njemačka), uzastopno tri puta u smjesi otapala metanol:diklormetan (MeOH/DCM, 1:1, v/v). Ekstrakt je filtriran kroz 0,45 µm PTFE filter te uparen u atmosferi dušika kako bi se uklonilo otapalo. U svrhu koncentriranja i pročišćavanja uzorka, korištena je metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*). Ukratko, ekstrakt je frakcioniran na C-18 koloni (masa sorbensa 1 g, kapacitet kolone 6 mL, veličina čestica 40 µm; Agilent Bond Elut, Waldbronn, Njemačka) korištenjem vakuuma te otapala različite polarnosti (voda, voda:metanol, metanol i diklormetan) kako bi se prikupile frakcije F3 i F4. Prethodno frakcioniranju, C-18 kolona kondicionirana je metanolom i ultračistom vodom. Uzorak je eluiran primjenom otapala opadajuće polarnosti kako bi se dobile frakcije F3 i F4. F3 je eluiran s MeOH, dok je F4 eluiran sa MeOH/DCM (1:1, v/v). Navedene frakcije su koncentrirane do konstantne mase pomoću vakuumskog koncentratora (SpeedVac, SPD1030, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) i pohranjene na 4 °C u tami do daljnje analize. Ekstrakcija i frakcioniranje provedeno je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku. Neposredno prije analize, frakcija F3 je otopljena u metanolu, dok je frakcija F4 otopljena u DMSO-u.

3.5. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI *IN VITRO*

3.5.1. ORAC metoda

ORAC metoda, odnosno metoda sposobnosti apsorpcije radikala kisika (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) temelji se na fluorescentnom signalu koji se gubi u prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Huang i sur., 2002). Dodatak antioksidansa apsorpira generirane ROS-ove donacijom vodika, omogućujući postojanost fluorescentnog signala i pružajući informacije o mehanizmu djelovanja spoja. Kao standard u ORAC metodi koristi se antioksidans Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), analog vitamina E koji je topljiv u vodi u rasponu koncentracija od 6,25 do 100 µmol/L. U mikrotitarske ploče se u triplicatu dodaje 150 µL radne otopine 4 µmol/L fluoresceina koji je pripremljen u razrijeđenju 1:1000 u 25 mL 0,075 fosfatnom puferu (pH 7,4). Paralelno se

dodaje po 25 μL uzorka, standarda (Trolox) i slijepe probe (0,075 M PBS). Pripremljena mikrotitarska ploča se stavlja na inkubaciju 30 minuta na 37 °C pri rotaciji od 100 rpm. Reakcija se pokreće na način da se u svaku pripremljenu jažicu na mikrotitarskoj ploči dodaje po 25 μL 75 mmol/L AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid) reagensa. Gubitak fluorescencije prati se pomoću spektrofotofluorimetra pri uvjetima ekscitacije na 485 nm, a emisije na 528 nm u rasponu od 3 sata te optimalnim korak fluorescencije od 188.

3.5.2. DPPH metoda

DPPH metoda (Brand-Williams i sur., 1995) jedna je od najčešće korištenih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti. Bazira se na kolorimetriji, odnosno na promjeni boje prilikom reakcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala s antioksidansom. U ovom radu, metoda je prilagođena za reakciju u mikrotitarskim pločama. Ukratko, u mikrotitarske ploče se dodaje 25 μL uzorka, 200 μL metanola te 25 μL ranije pripremljene otopine DPPH radikala (240 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Kao kontrola se koristi otapalo u kojem je uzorak pripremljen umjesto uzorka, dok slijepu probu čini 225 μL metanola i 25 μL otapala u kojem je uzorak otopljen. Nakon 30-minutne inkubacije uzoraka u mraku, mjeri se apsorbancija na 490 nm. Za izradu baždarnog dijagrama koristi se askorbinska kiselina u rasponu koncentracija od 0,01 do 0,3 mmol/L u metanolu.

3.5.3. FRAP metoda

FRAP metoda, punog naziva sposobnost redukcije željezova iona (engl. *ferric reducing/antioxidant power*) bazira se na redukciji željezova (III) iona (Fe^{3+} iona, feri oblik) u željezov (II) ion (Fe^{2+} ion, fero oblik) u prisutnosti antioksidansa. Nastali ion u prisutnosti TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) reagensa formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorbancije pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996). FRAP reagens se priprema dnevno miješajući jednaki volumen 10 mM TPTZ pripremljenog u 40 mmol/L klorovodičnoj kiselini te 20 mM vodene otopine željezova (III) klorida (FeCl_3). Otopinu je potrebno razrijediti pet puta pomoću 0,25 mol/L acetatnog pufera (pH 3,6). Postupak se bazira na mjerenju u mikrotitarskim pločama u triplikatu nakon provedene reakcije između 3,9 mL FRAP reagensa i 100 μL uzorka u trajanju od 10 min na 37 °C. Optička gustoća se mjeri pri 593 nm. Kao standard se koristi otopina željezovog sulfata, FeSO_4 .

3.6. ANALIZA INHIBICIJE ENZIMA KOLAGENAZE

Ispitivanje je provedeno uz pomoć kita za određivanje kolagenazne aktivnosti prema uputama proizvođača. Kit je sadržavao pufer (20 mL), enzim kolagenaze (0,35 U/mL; 1 mL); supstrat za kolagenazu (N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala; FALGPA; 4 mL); inhibitor (1,10-phenanthroline, 1 M; 50 µL). Uzorci i kontrole raspoređeni su u transparentnu ploču sa 96 jažica prema protokolu navedenom u tablici 4. Ukupan volumen u jažicama bio je 100 µL.

Tablica 4. Priprema uzoraka i kontrola eksperimenta

Reagent	Uzorak	Kontrola enzima	Kontrola inhibitora	Kontrola medija
Uzorak (frakcija makroalgi)	10 µL	–	–	–
Enzim kolagenaze (0,35 U/mL)	10 µL	10 µL	10 µL	–
Inhibitor (1,10-Phenanthroline)	–	–	2 µL	–
Pufer	80 µL	90 µL	88 µL	100 µL
Ukupni volumen	100 µL			

Nakon što je sve otpipetirano, plate se inkubirao 10 minuta u mraku. Nakon inkubacije u svaku jažicu dodano je 100 µL reakcijske smjese koja se sastojala od 40 µL FALGPA i 60 µL pufera. Nakon toga, pomoću spektrofotofluorimetra izmjerena je absorbancija pri valnoj duljini od 345 nm i temperaturi od 37 °C. Absorbancija je mjerena svake 3 minute u periodu od 21 minute.

Za izračun kolagenazne aktivnosti korištena je formula:

$$\frac{\left(\frac{\Delta A_{345} \text{ uzorka}}{\Delta T} - \frac{-A_{345} \text{ medija}}{\Delta T} \right) \times (0,2) \times DF}{(0,53) \times V},$$

gdje je ΔA_{345} = razlika absorbancije u vremenu T_1 i T_2 ; ΔT = razlika između vremena T_1 i T_2 ;

0,2 = reakcijski volumen (mL); DF= faktor razrjeđenja, 0,53 = ekstinkcijski koeficijent FALGPA; V=volumen enzima.

Za izračun inhibicije enzima kolagenaze korištena je formula:

$$\%inhibicije = \frac{Aktivnost_{(enzim)} - Aktivnost_{(inhibitor/uzorak)}}{Aktivnost_{(enzim)}} \times 100$$

3.7. ODRŽAVANJE ZEBRICA *Danio rerio* I MRIJEST

U svrhu ovog istraživanja kao modelni organizam korištena je riba zebrica *Danio rerio*, divlji WIK soj, dopremljena iz Europskog resursnog centra, Instituta za tehnologiju Karlsruhe (KIT) u Njemačkoj. Odrasle zebrice su uzgajane i održavane u ZebTEC samoregulirajućem sustavu s Active Blue tehnologijom (Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italija) pri kontinuiranim periodima dana i noći 14:10 h (slika 6). Uvjeti vode su strogo kontrolirani. Tijekom uzgoja i održavanja odraslih jedinki temperatura je iznosila $27,00 \pm 0,09$ °C, pH vrijednost $7,60 \pm 0,08$, vodljivost $494,80 \pm 2,61$ μS/cm, a zasićenost otopljenog kisika ≥ 95 %. Odrasle jedinke hranjene su tri puta dnevno smrznutim račićima *Artemia* sp.

Prije postavljanja samog eksperimenta odvojile su se odrasle jedinke zebrica u omjeru 2:1, mužjaci:ženke. Zebrice su stavljene u mrijesticu (iSpawn-S Benchtop Size Breeding System, Tecniplast S.p.A.) u kojoj su se s obzirom na spol odvojile pregradom. Idući dan ujutro, pregrada je maknuta. Na taj način su mužjaci i ženke spojeni. Važno je podignuti platformu za mrijest kako bi se imitirali prirodni uvjeti okoliša u kojem se mrijeste u plićaku. Nakon 30 minuta od mrijesta pomoću sita (promjer oka: 800 μm) su se skupila jajašca te su ista isprana vodom kako bi se uklonile moguće nečistoće (Babić i sur., 2021).



Slika 6. a) ZebTEC samoregulirajući sustav za uzgoj zebrića s Active Blue tehnologijom (Tecniplast S.p.A.) unutar kojeg se odvija uzgoj i održavanje zebrića (lijevo) i b) Mrijestilica iSpawn-S Benchtop Size Breeding System (Tecniplast S.p.A.) koja se koristila za mrijest zebrića (*vlastita fotografija*)

3.7.1. Test embriotoksičnosti

Test embriotoksičnosti na embrijima ribe zebriće *Danio rerio* proveden je prema standardiziranom OECD 236 protokolu (2013). Unutar 90 min nakon oplodnje, uz pomoć stereomikroskopa (Leica, Njemačka) (slika 7) odvojena su oplođena jajašca od neoplođenih ili oštećenih. Nakon toga, embriji su postavljeni u polietilenske prozirne pločice s 24 jažice (NEST Scientific, SAD). Svaka jažica sadržavala je 1 mL testiranog uzorka (n=5 embrija po jažici). U svrhu ispitivanja embriotoksičnosti upotrijebljeno je 10 embrija u 3 replike, što iznosi 30 embrija po ispitanoj koncentraciji. Frakcije F3 i F4 ispitane su u 6 koncentracija - 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 i 1,5625 $\mu\text{g/mL}$. Za pripremu razrijeđenja i kao negativna kontrola koristila se umjetna voda (engl. *artificial water*; 294,0 mg/L kalcij klorid dihidrata ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 123,3 mg/L magnezij sulfata ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), 63,0 mg/L natrijevog bikarbonata (NaHCO_3) i 5,5 mg/L kalij klorida (KCl)). Pripremljeni uzorci su aerirani do 100 %-tnog zasićenja kisikom

te temperirani na 27,5 °C. S obzirom na sadržaj otapala u testiranim frakcijama, kao dodatna kontrola otapala ispitan je 1 % metanol i 1 % DMSO. Kako bi se izbjeglo isparavanje uzoraka, rubovi pločica su omotani parafilmom. Pločice s embrijima su inkubirane na $27,5 \pm 0,5$ °C (Phoenix Instrument inkubator TIN-IN35). Nakon 96 h razvoja praćeno je preživljavanje, pojava razvojnih abnormalnosti te stopa izvaljivanja ličinka iz koriona. Ispitana je i kardiotsičnost na način da su se brojali otkucaji srca kod 15 nasumično odabranih jedinki unutar 15 sekundi. Na taj način utvrđene su koncentracije ispitivanih frakcija koje ne uzrokuju negativan učinak na embrionalni razvoj.



Slika 7. a) Stereomikroskop S6E, Leica (lijevo) i b) Petrijeva ploča s jajašcima dobivenima unutar jednog mrijesta (desno) (*vlastita fotografija*)

3.7.2. Ispitivanje antioksidativnog potencijala *in vivo* upotrebom zebrice

Koncentracije ispitanih frakcija koje unutar testa embriotoksičnosti nisu pokazale toksični potencijal, odabrane su za daljnje ispitivanje antioksidativnog potencijala *in vivo* upotrebom zebrice *Danio rerio*. Istraživanje se bazira na praćenju protektivnog učinka testiranog spoja na stvaranje oksidativnog stresa u zebricama inducirano vodikovim peroksidom.

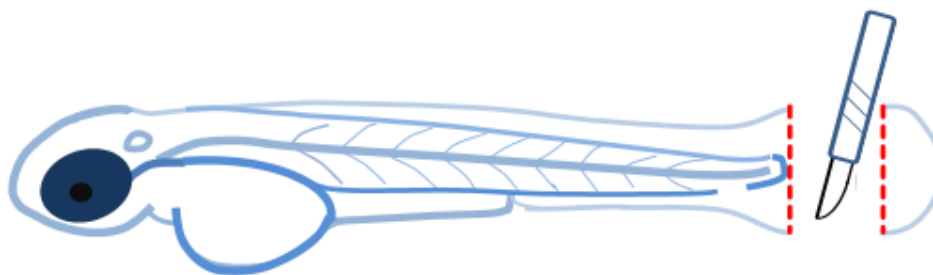
Prema protokolu detaljno opisanom u poglavlju 3.7.1., embriji su tretirani testiranim frakcijama u periodu od 2 h. Nakon 2 h, embriji (N=5 embrija po jažici) su izloženi 1 mL testiranog uzorka. Unutar pokusa postojala su tri tretmana. Unutar prvog tretmana embriji su izloženi 5 mM vodikovom peroksidu (pozitivna kontrola), dok je drugi tretman obuhvaćao embrije izložene mediju za uzgoj zebrica (umjetnoj vodi; negativna kontrola). Treći je tretman obuhvaćao embrije izložene mješavini ispitivanih frakcija i 5 mM vodikovog peroksida. Ploče s embrijima su inkubirane na $27,5 \pm 0,5$ °C (TIN-IN35, Phoenix, Njemačka) u periodu od 96 h. Nakon 96 h, ličinke su izložene 10 μ M CM-H₂DCFDA. Nakon unosa u stanicu, CM-H₂DCFDA hidrolizira pomoću nespecifičnih esteraza i oslobađa 2'7'-diklorodihidrofluorescein (CM-H₂DCF), koji nadalje u reakciji s ROS-ovima oksidira do CM-DCF spoja koji emitira fluorescenciju. Količina ROS-ova nastalih uslijed oksidativnog stresa je proporcionalna nastaloj fluorescenciji. Inkubacija ličinaka u CM-H₂DCFDA boji trajala je 1 h, nakon čega su isprane tri puta umjetnom vodom kako bi se uklonila fluorescentna boja s površine tijela. Ličinke su zatim pojedinačno raspoređene u crnu pločice u s 96 jažica (engl. *well plate*; Thermo Fisher Scientific, SAD). Intenzitet fluorescence mjerio se pomoću spektrofotometra (Infinite M200, PRO, TECAN, Švicarska). Ekscitacija je postavljena na 495 nm, a emisija na 525 nm. Prije samog mjerenja ličinke su tretirane s 0,03 % MS-222 anestetikom kako bi tijekom mjerenja fluorescence bile mirne. Antioksidativni potencijal frakcije F4 *Cystoseira compressa* očitovao se u smanjenju intenziteta fluorescencije kod jedinki izlaganoj ispitanoj frakciji i H₂O₂ u odnosu na jedinke izlagane isključivo H₂O₂.

3.7.3. Ispitivanje regenerativnog potencijala *in vivo* upotrebom zebrice

Nakon mrijesta detaljno opisanog u u paragrafu 3.7.1. poglavlju, embriji su inkubirani do 72. sata nakon oplodnje u umjetnoj vodi. Nakon 72 sata, jedinke su anestetizirane s 0,02 % MS-222, nakon čega je skalpelom izvršena amputacija repne peraje (slika 8). Nakon

amputacije, jedinke su pojedinačno raspoređene u prozirne ploče sa 24 jažice s 1 mL testiranog uzorka. Frakcija F3 ispitana je u koncentracijama od 12,5; 6,25 i 3,125 $\mu\text{g/mL}$, dok je F4 ispitana u 50, 25 i 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Kontrolna skupina je nakon amputacije bila izložena umjetnoj vodi. U svrhu dodatne kontrole otapala, zebrice sa amputiranim repovima izložene su i 1 % metanolu i 1 % DMSO-u. Jedinkama je uslikan rep neposredno prije amputacije te nakon 48 h nakon amputacije.

Tijekom trajanja eksperimenta, zebricama je svakodnevno zamijenjeno 30 % volumena sa svježe pripremljenim uzorcima. Slike prije amputacije repa te nakon amputacije su preklopljene pomoću PhotoScape progama. Za izračun regenerirane površine repa korišten je Microsoft® AnalySIS Soft softver. Svi pokusi napravljeni unutar ovog istraživanja provedeni su na nezaštićenim embrionalnim/ličinačkim stadijima (do 120. sata nakon oplodnje), za koje nije potrebna suglasnost Etičkog povjerenstva o provedbi istraživanja.



Slika 8. Shema amputacije repne peraje (prema Gu i sur., 2020)

3.8. Statistička obrada podataka

Statistička obrada i grafički prikaz dobivenih rezultata napravljen je unutar GraphPad Prism 6.01. statističkog programa. Rezultati su izraženi u obliku srednje vrijednosti svih testnih replika uz pridruženu vrijednost standardne devijacije (\pm SD), a p-vrijednost manja ili jednaka od 0,05 ($p \leq 0,05$) korištena je kao granična vrijednost statističke značajnosti. Razlike između eksperimentalnih grupa i kontrolne skupine testirane su jednosmjernom analizom varijance *one way* ANOVA. Normalnost raspodjele podataka provjerena je D'Agostino-Pearson testom normalnosti. Ukoliko je raspodjela podataka odstupala od normalne (neparametrijske metode), za usporedbu više skupina korišten je Kruskal-Wallis test. Statistički značajnim smatrani su rezultati koji su se razlikovali na razini $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) te $p < 0,001$ (***). Intenzitet fluorescencije kvantificiran je pomoću programa ImageJ.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KEMIJSKA ANALIZA

Kemijska analiza ispitivanih frakcija F3 (metanolna) i F4 (diklormetanska) smeđe makroalge *Cystoseira compressa* odrađena je od strane kolega sa Sjevernog (arktičkog) saveznog sveučilišta u Rusiji, Laboratorij za analitičku kemiju okoliša, Core Facility Center “Arktika”. Kemijska analiza provedena je upotrebom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti - masene spektrometrije visoke rezolucije (HPLC-ESI-HRMS) prema protokolu detaljno opisanom u publikaciji Jerković i sur. (2021). Identificiran je 31 spoj koji pripadaju skupini pigmentata, derivatima masnih kiselina, steroidima i terpenima (Tablica 5). Tablica je dodana u rad kako bi omogućila jasniju interpretaciju rezultata dobivenih biološkim ispitivanjima.

Tablica 5. Glavni identificirani spojevi u frakcijama F3 i F4 smeđe makroalge *Cystoseira compressa* pomoću HPLC-ESI-HRMS analize

Br oj	Spoj	RT, min	Kemijska formula	[M+H] ⁺ (Error, ppm)	Područje pika	
					F3	F4
1	Loliolid	4.36	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	197.1173 (0.4)	489424	168976
2	(1 α ,2 β ,3 β ,5 β ,9 ξ ,17 ξ ,22R)- 1,2,3,14,20,22,25- heptahidroksil-6-oksokolest-7- en-5-il β -D-glukopiranozid	9.88	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₄	675.3595 (1.3)	31900	690
3	(3 β ,5 α ,20S)-3,21- dihidroksipregnan-20-il β -D- glukopiranooiduronska kiselina	10.84	C ₂₇ H ₄₄ O ₉	513.3066 (1.5)	70500	1400
4	Sargakinoična kiselina	12.64	C ₂₇ H ₃₆ O ₄	425.2691 (1.1)	158000	5400
5	Glicerol monomiristat	12.96	C ₁₇ H ₃₄ O ₄	303.2533 (1.0)	1318000	357000
6	1,3-dihidroksi-2-propanil 5,8,11,14-ikosatetraenoat	13.74	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	379.2846 (0.8)	287800	22100
7	Halocintijaksantin	13.76	C ₄₂ H ₅₆ O ₅	641.4212 (1.8)	1358000	4100
8	Glicerol palmitat	14.09	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	331.2849 (1.9)	10231000	4321200
9	Palmitamid	14.37	C ₁₆ H ₃₃ NO	256.2630 (-1.9)	349100	20500
10	Glicerol monooleat	14.40	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	357.3000 (0.2)	681600	52900
11	Arahidonska kiselina	14.56	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	305.2472 (-1.0)	496600	65400
12	Oleamid	14.65	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2790 (-0.5)	1624000	365800
13	Glicerol monostearat	15.14	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	359.3160 (1.2)	9725000	5500300
14	Fukoksantin	15.49	C ₄₂ H ₅₈ O ₆	659.4308 (0.3)	934400	18800
15	2-Metoksietil palmitat	15.63	C ₁₉ H ₃₈ O ₃	315.2891 (-0.9)	162500	1939000
16	24-hidroperoksi-24-vinil- kolesterol	16.09	C ₂₉ H ₄₈ O ₃	445.3671 (-1.2)	68600	293800

Tablica 5. Glavni identificirani spojevi u frakcijama F3 i F4 smeđe makroalge *Cystoseira compressa* pomoću HPLC-ESI-HRMS analize – nastavak

17	(8ξ,9ξ,10α,14ξ)-3,20-diokso-6,19-epoksipregn-4-en-21-il (9E)-9-oktadekanoat	16.14	C ₃₉ H ₆₀ O ₅	609.4510 (-0.6)	356400	11200
18	11 hidroksi-3,20-dioksopregn-4-en-21-il (9E)-9-oktadekanoat	16.52	C ₃₉ H ₆₂ O ₅	611.4664 (-1.0)	1012000	46800
19	2-hidroksipropil stearat	16.62	C ₂₁ H ₄₂ O ₃	343.3204 (-0.8)	336900	3695000
20	Erukamid	16.66	C ₂₂ H ₄₃ NO	338.3418 (0.2)	6703000	2207000
21	Feoforbid A	16.80	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593.2752 (-1.1)	512100	3569000
22	1-O-heksadekanoil-2-O-(9Z,12Z-oktadekadienoil)-3-O-[α-D-galaktopiranozil-(1'"-6')-O-β-D-galaktopiranozil]-glicerol	16.98	C ₄₉ H ₈₈ O ₁₅	917.6197 (0.1)	56700	10800
23	(2S)-3-(β-D-galaktopiranosiloksi)-2-(palmitoiloksi) propil (9Z,12Z)-9,12-oktadekadienoat	18.44	C ₄₃ H ₇₈ O ₁₀	755.5656 (-1.6)	1171200	230400
24	(2S)-3-(β-D-galaktopiranosiloksi)-2-(palmitoiloksi)propil (9E)-9-oktadekanoat	19.12	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₀	757.5806 (-2.4)	374600	437000
25	Dipalmitin	20.88	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	569.5130 (-1.7)	413600	110400
26	Metil (3R,10Z,14Z,20Z,22S,23S)-12-etil-3-hidroksi-13,18,22,27-tetrametil-5-okso-23-(3-okso-3-{{(2E,7R,11R)-3,7,11,15-tetrametil-2-heksadecen-1-il}oksi}propil)-17-vinil-4-oksa-8,24,25,26-tetraazaheksaciklo [19.2.1.16,9.111,14.116,19.02,7] heptakoza-1(24), 2(7),6(27),8,10,12,14,16,18,20-dekaen-3-karboksilat	21.53	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₇	903.5625 (-0.6)	8300	13054000
27	Stearoilpalmitoilglicerol	21.57	C ₃₇ H ₇₂ O ₅	597.5453 (-1.6)	238400	75100
28	Metil (3S,4S,21R)-14-etil-13-(hidroksimetil)-4,8,18-trimetil-20-okso-3-(3-okso-3-{{(2E,7R,11R)-3,7,11,15-tetrametil-2-heksadecen-1-il}oksi}propil)-9-vinil-24,25-dihidro-21-forbinkarboksilat ili izomeri	21.64	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₆	887.5673 (-0.9)	12600	9985000
29	Feofitin b	22.04	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆	885.5521 (-0.4)	23000	2402000
30	Distearin	22.26	C ₃₉ H ₇₆ O ₅	625.5748 (-2.8)	41500	13700
31	Feofitin a	22.76	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	871.5722 (-1.1)	47200	26756000

4.2. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL FRAKCIJA MAKROALGE *Cystoseira compressa*

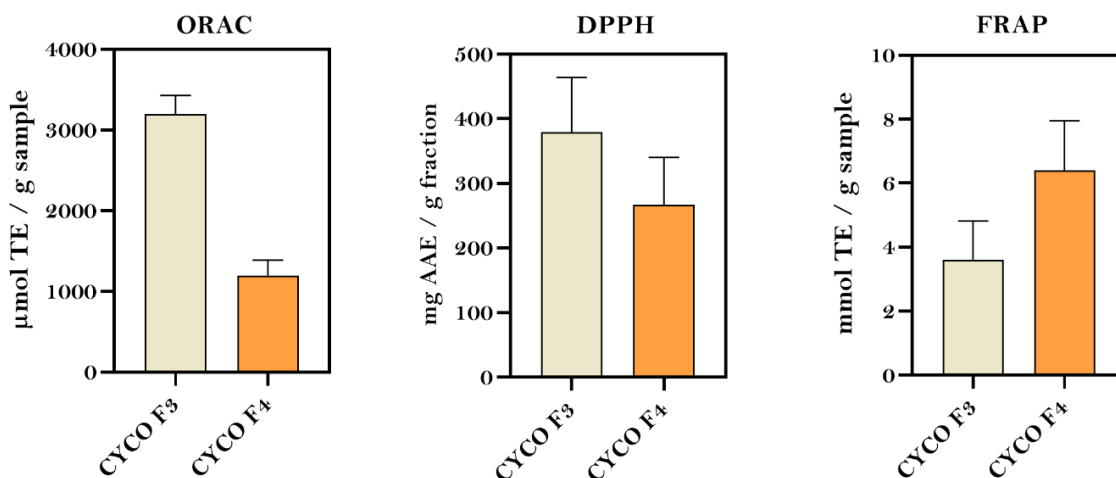
Antioksidativni potencijal ispitivanih frakcija određen je pomoću tri metode. To su ORAC, DPPH i FRAP metoda.

ORAC je antioksidacijska metoda pri kojoj antioksidansi doniraju proton peroksilnom radikalu te ga na taj način neutraliziraju. Dolazi do reakcije radikala s fluoresceinom pri čemu nastaje nefluorescentni produkt te dolazi do pada intenziteta fluorescencije. Dodatkom antioksidansa dolazi do neutralizacije nastalih slobodnih radikala, što omogućuje održavanje fluorescencijskog signala. Rezultati ORAC metode pokazuju kako veću antioksidativnu aktivnost ima frakcija F3 *Cystoseira compressa* ($3194,08 \pm 233,53 \mu\text{mol TE/ g}$ uzorka). Antioksidativna aktivnost frakcije F4 *Cystoseira compressa* iznosi $1197,17 \pm 192,43 \mu\text{mol TE/ g}$ uzorka (slika 9), što je 3x manja zabilježena aktivnost u odnosu na frakciju F3. U istraživanju provedenom 2021. ispitivao se antioksidativni potencijal smeđe makroalge *Fucus virsoides* pomoću ORAC metode, gdje je metanolna frakcija, pripremljena na isti način kao i unutar ovog istraživanja, također pokazala veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na diklormetansku frakciju F4 *Fucus virsoides* (Jerković i sur., 2021). Kao jedan od mogućih razloga tome autori su istaknuli veću koncentracija fukoksantina u frakciji F3 *Fucus virsoides*, što se može povezati i s rezultatima ovog istraživanja. Karotenoid fukoksantin identificiran je u obje frakcije makroalge *Cystoseira compressa*, F3 i F4, sa značajno većim udjelom u frakciji F3. Upravo zbog tog razloga se može zaključiti kako je sadržaj fukoksantina doprinio većoj antioksidativnoj aktivnosti. Sadržaj fukoksantina u različitim vrstama smeđih algi može se razlikovati zbog individualnih značajki vrste, ali i zbog okolišnih čimbenika. Dominantno je prisutan u smeđim algama, dok ga se u zelenim i crvenim može naći u nešto manjim udjelima (Maeda i sur., 2018).

DPPH metoda je metoda u kojoj dolazi do reakcije DPPH radikala s antioksidansom. Reakcije se temelji na redukciji DPPH radikala kojemu se donira atom vodika. Tako nastaje DPPHH i radikal antioksidansa (A^{\cdot}). DPPH metoda bazira se na dva mehanizma djelovanja, prvi je kroz prijenos jednog elektrona (engl. *single electron transfer, ET*) ili kroz reakciju prijenosa atoma vodika (hydrogen atom transfer, HAT) (Radman i sur., 2021). Prema rezultatima DPPH metode također je, kao i kod ORAC metode, vidljiv veći antioksidativni potencijal frakcije F3 *Cystoseira compressa* ($365,02 \pm 89,57 \text{ mg AAE/g}$ frakcije) u usporedbi s frakcijom F4 ($241,37 \pm 81,95 \text{ mg AAE/g}$ frakcije) (slika 9).

FRAP metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} prisutnog u reganesu TPTZ (željezo(III)-2,4,6- tri(2-piridil)-s-tirazin) s antioksidansom putem prijenosa jednog elektrona SET) (Radman i sur., 2021). Rezultati FRAP metode pokazuju veću antioksidativnu aktivnost F4 frakcije ($6,40 \pm 1,55$ mmol TE/g uzorka) u odnosu na F3 *Cystoseira compressa* frakciju ($3,30 \pm 0,97$ mmol TE/g uzorka) (slika 9). Razlog zašto je ovom metodom utvrđena veća antioksidativna aktivnost diklormetanske frakcije F4 *Cystoseira compressa* može biti u tome što feofitin A i B, raspadni produkti klorofila već poznati po svom antioksidativnom djelovanju (Lee i sur., 2021), dominiraju u frakciji F4 *Cystoseira compressa* u usporedbi s frakcijom F3. U molekulskim strukturama feofitina A i B prisutan je bočni lanac s kojeg dolazi do lakšeg prijenosa elektrona te to posljedično uzrokuje veću FRAP aktivnost frakcije F4 (Pangestuti i sur., 2011).

Važno je napomenuti kako dobiveni rezultati antioksidativnog potencijala nisu rezultat prisutnosti jednog spoja, već su rezultat sinergističkog djelovanja nekolicine antioksidansa prisutnih u ispitivanim frakcijama *Cystoseira compressa*.



Slika 9. Prikaz antioksidativnog potencijala frakcija makroalge *Cystoseira compressa* pomoću *in vitro* metoda (ORAC, DPPH, FRAP)

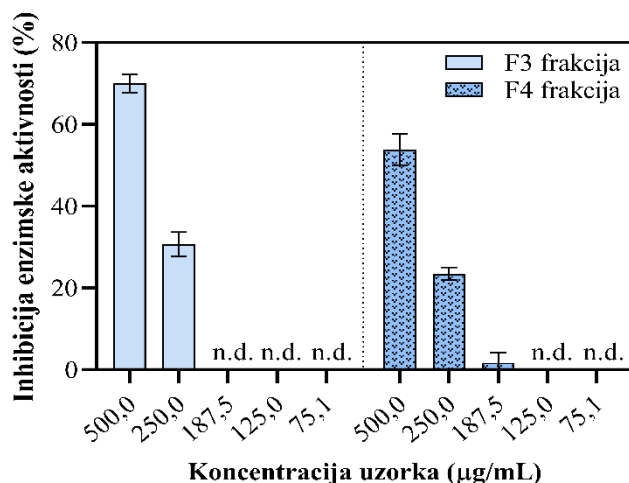
4.3. ANALIZA INHIBICIJE ENZIMA KOLAGENAZE

Slika 10 prikazuje inhibiciju enzima kolagenaze frakcijama makroalge *Cystoseira compressa*. Obje frakcije (F3 i F4) učinkovito su smanjile aktivnost kolagenaze u ovisnosti o koncentraciji. Frakcija F3 *Cystoseira compressa* pri koncentraciji 500 µg/mL imala je inhibitorni učinak od 70,08 %, a pri koncentraciji 250 µg/mL 30,69 %. Pri nižim koncentracijama (187,5, 125 i 75,1 µg/mL) nije uočeni inhibitorni učinak. Frakcija F4 *Cystoseira compressa* pri koncentraciji 500 µg/mL pokazala je inhibitorni učinak od 53,86 %, a pri koncentraciji 250 µg/mL 23,48 %. Pri koncentraciji 187,5 µg/mL inhibitorni učinak iznosio je svega 3,46%, dok je pri koncentracijama 125 i 75,1 µg/mL u potpunosti izostao.

Literaturnim pregledom utvrđeno je da morske makroalge sadrže širok raspon bioaktivnih komponenti koje mogu djelovati kao inhibitori kolagenaze i to su prvenstveno polifenoli poput flavonoida, tokoferola, fenolnih kiselina i tanina (Thring i sur., 2009). Istovremeno, pronađeno je svega par odgovarajućih publikacija s kojima bi se mogli usporediti rezultati dobiveni u ovom istraživanju. Nurrochmad i sur. (2018) ispitivali su utjecaj ekstrakta i frakcije smeđe alge *Turbinaria decurrens* na inhibiciju kolagenaze, elastaze, tirozinaze, kao i antioksidativnu aktivnost. Inhibicija kolagenaze zabilježena je kod oba uzroka *Turbinaria decurrens* te je povezana s visokim udjelom fukoksantina u uzrocima (u ekstraktu: $284,9 \pm 3,3$ µg/g suhe tvari; u frakciji: $653,4 \pm 30,6$ µg/g suhe tvari). Susano i sur. (2021) također su ispitivali biološki potencijal smeđe alge *Carpomitra costata* na inhibiciju kolagenaze, elastaze i tirozinaze. Rezultati su pokazali kako je jak inhibitorni potencijal povezan s visokim sadržajem fenolnih spojeva, točnije florotanina. Međutim, osim florotanina, autori su sugerirali kako je za inhibiciju navedenih enzima odgovoran i fukoksantin (Susano i sur., 2021). Daljnja istraživanja na staničnim kulturama ukazala su na to kako fukoksantin ima potencijal smanjivanja nastalih slobodnih radikala u ljudskim dermalnim fibroblastima nastalima uslijed UVB zračenja (Heo i Jeon, 2009). Također, fukoksantin inducira stopu preživljavanja stanica te inhibira oštećenja, što ukazuje na njegovu mogućnost da zaštiti kožu od foto oštećenja izazvanih UVB zračenjem (Nurrochmad i sur., 2018).

Fukoksantin je detektiran i u frakcijama *Cystoseira compressa* ispitivanima unutar ovog istraživanja. Veći udio fukoksantina detektiran je u frakciji F3. S obzirom da rezultati pokazuju veću inhibiciju enzimske aktivnosti kolagenaze pri frakciji F3 *Cystoseira compressa*, dobivenu aktivnost se može povezati s prisutnošću većeg udjela fukoksantina. Svakako, ne smije se

zanemariti prisutnost feofitina a i b, kao niti feoforbida a. Navedeni spojevi mogli su doprinijeti inhibitornom učinku frakcije F4 u kojoj su prisutni u većem udjelu nego li je to detektirano u frakciji F3. Lee i sur. (2021) utvrdili su pozitivan učinak feoforbida a na fibroblaste ozračene UVB zračenjem, što posljedično može dovesti do spriječavanja nastanka oksidativnog stresa i oštećenja DNA, kao i umanjivanja/spriječavanja oštećenja kože i nastanka bora.



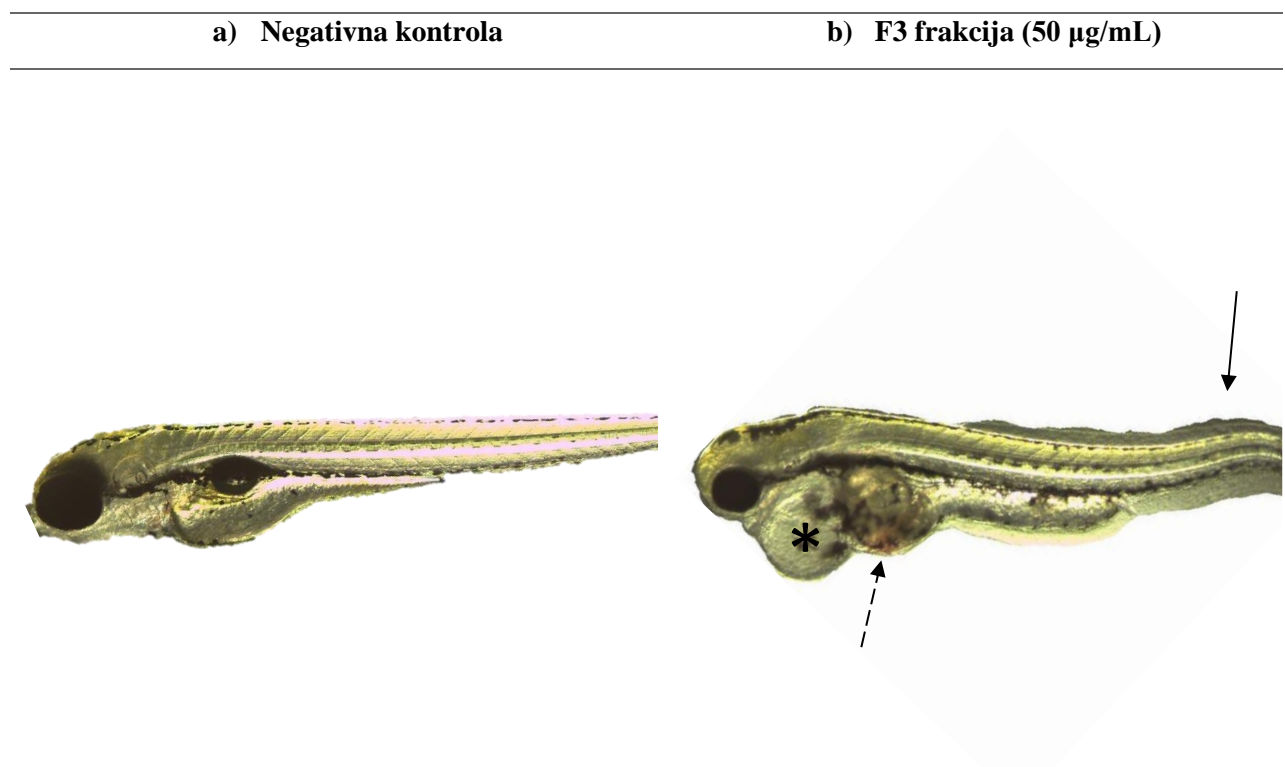
Slika 10. Prikaz inhibicije aktivnosti enzima kolagenaze pomoću F3 i F4 frakcije smeđe alge *Cystoseira compressa*. n.d.=nije detektirana inhibicija

4.4. EMBRIOTOKSIČNOST ISPITIVANIH FRAKCIJA

Tijekom izlaganja embrija zebrice *Danio rerio* serijskim razrjeđenjima frakcije F3 *Cystoseira compressa* u rasponu od 12,5 do 1,6 µg/mL) nije zabilježen negativan utjecaj na preživljavanje i razvoj embrija. Pri višim koncentracijama F3 frakcije od 50 µg/mL i 25 µg/mL zabilježen je 100 %-tni mortalitet. Pri koncentraciji 50 µg/mL došlo je do porasta stope abnormalnosti od 20 %, a pri koncentraciji 25 µg/mL od 10 %. Najčešći subletalni učinci bili su skolioza i perikardijalni edem (slika 11). Iz tog razloga, ova koncentracija izuzeta je iz daljnjeg ispitivanja. Tijekom izlaganja embrija zebrice *Danio rerio* F4 frakciji smeđe makroalge *Cystoseira compressa* unutar raspona koncentracija od 50 do 1,6 µg/mL nije došlo do statistički značajnog porasta stope mortaliteta niti stope abnormalnosti. Prilikom ispitivanja kardiotoxicnosti, ni jedna frakcija nije pokazala promjenu u otkucajima srca.

Prema rezultatima kemijske analize (tablica 4) vidi se da frakcije sadrže amide masnih kiselina poput amida palmitinske kiseline, oleamida i erukamida. Uspoređujući F3 i F4 frakciju

može se primijetiti kako frakcija F3 sadrži veće udjele prisutnih amida, što se može povezati s pojavom toksičnosti pri višim koncentracijama navedene frakcije. Slični rezultati zabilježeni su u nedavnim publikacijama Radman i sur. gdje su F3 i F4 frakcije zelene makroalge *Dasycladus vermicularis* (Radman i sur., 2021) te smeđih makroalgi *Ericaria crinita* i *Ericaria amentacea* (Radman i sur., 2022) obogaćene spomenutim amidima negativno utjecale na preživljavanje i embrionalni razvoj zebrice.



Slika 11. Prikaz razvojnih abnormalnosti kod ličinke *Danio rerio* izlagane 96 sati F3 frakciji *Cystoseira compressa* (50 µg/mL): a) normalno razvijena ličinka u kontrolnoj skupini ; b) skolioza (puna strelica), perikardijalni edem (zvjezdica), krvarenje u području žumanjčane vreće (isprekidana strelica)

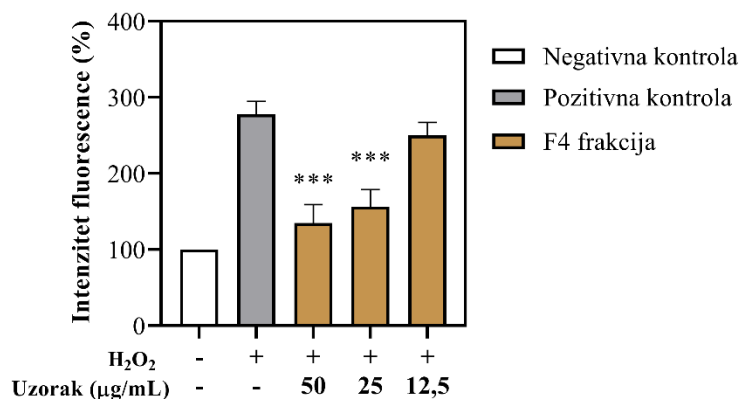
4.5. ZAŠTITNI UTJECAJ FRAKCIJA MAKROALGE NA NASTANAK OKSIDATIVNOG STRESA KOD LIČINKI IZLOŽENIH VODIKOVOM PEROKSIDU

Kao potvrda *in vitro* ispitivanjima (vidi poglavlje 4.2.), antioksidativni potencijal ispitivanih frakcija dodatno je određen u živim ličinkama zebrice *Danio rerio* izloženim vodikovom peroksidu.

Kod zebrica izloženih vodikovom peroksidu došlo je do porasta oksidativnog stresa, što se očitovalo u statistički značajnom porastu intenziteta fluorescence od 177,7 % u odnosu na skupinu izloženu negativnoj kontroli.

Antioksidativni potencijal frakcije F4 *Cystoseira compressa* testiran je u tri koncentracije: 50, 25 i 12,5 µg/mL. Kao što je prikazano na slici 12, frakcija F4 *Cystoseira compressa* u koncentraciji 50 µg/mL smanjila je negativan utjecaj vodikovog peroksida, što se očitovalo u smanjenju intenziteta fluorescence za 105,7 % (<0,0001). Pri koncentraciji F4 frakcije od 25 µg/mL zabilježeno je smanjenje fluorescence od 77,44 % (<0,0001) u odnosu na kontrolnu grupu na vodikovom peroksidu. Koncentracija od 12,5 µg/mL nije uzrokovala statistički značajno smanjenje fluorescence u odnosu na pozitivnu kontrolu (p=0,24). Kao što se može primijetiti iz kemijske analize, F4 frakcija sadrži brojne bioaktivne molekule s već dokazanim antioksidativnim potencijalom, poput fukoksantina, feofitina A i B, feoforbida A. Jerković i sur. (2021) također su ispitivali antioksidativni potencijal metanolne (F3) i diklormetanske (F4) frakcije smeđe alge *Fucus virsoides* upotrebom zebrice *Danio rerio*. Frakcija F4 *Fucus virsoides* u koncentraciji od 112,5 µg/mL uzrokovala je 29,5 %-tno smanjenje fluorescence. S obzirom na rezultate dobivene unutar ovog istraživanja, može se zaključiti kako diklormetanska frakcija *Cystoseira compressa* posjeduje veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na diklormetansku frakciju *Fucus virsoides*. Usporedbom kemijske analize frakcija obje makroalge, može se pretpostaviti kako su fukoksantin, feoforbida a te feofitina a i b, prisutni u većem udjelu upravo u algi *Cystoseira compressa*, odgovorni za veću antioksidativnu aktivnost F4 frakcije.

Metanolna (F3) frakcija *Cystoseira compressa* ispitana je u tri koncentracije: 12,5, 6,25 i 3,125 µg/mL. Ispitane koncentracije nisu pokazale statistički značajno smanjenje fluorescence u usporedbi sa skupinom izloženom vodikovom peroksidu. Zbog zabilježene toksičnosti (vidi poglavlje 4.4.) na višim koncentracijama F3 frakcije nije bilo moguće ispitati antioksidativni potencijal pri 50 i 25 µg/mL, što može biti jedno od objašnjenja dobivenih rezultata.



Slika 12. Prikaz zaštitnog utjecaja diklormetanske (F4) frakcije makroalge *Cystoseira compressa* na pojavu oksidativnog stresa uzrokovanog vodikovim peroksidom

Statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu grupu (H₂O₂) označena je * (***)p < 0,001). Rezultati su normirani na negativnu kontrolu (100%) te prikazani kao intenzitet fluorescence (%)

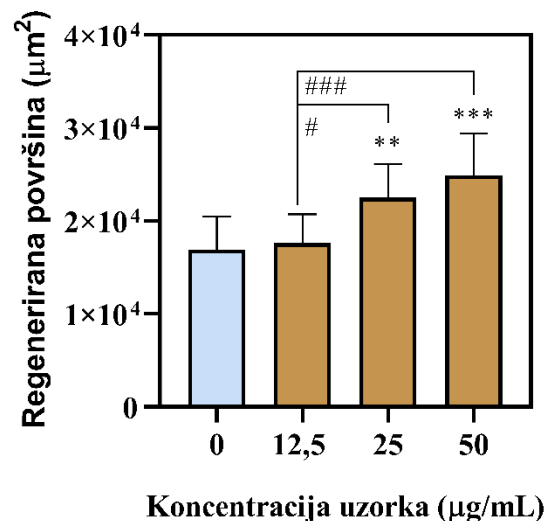
4.6. REGENERATIVNI POTENCIJAL TESTIRANIH FRAKCIJA ISPITAN *IN VIVO* UPOTREBOM ZEBRICE

48 sati od amputacije repne peraje izmjerena je regenerirana površina kod zebrića izloženih F3 i F4 frakcijama.

Testirani uzorak F4 *Cystoseira compressa* pri koncentracijama 50 i 25 µg/mL doveo je do povećanja regenerirane površine repne peraje u odnosu na kontrolnu skupinu (slike 13 i 14). Srednja vrijednost regenerirane površine pri koncentraciji 50 µg/mL iznosila je 24899,2 µm² (p < 0,0001), dok je pri 25 µg/mL iznosila je 22532,7 µm² (p=0,0045). Srednja vrijednost regenerirane površine pri najmanjoj ispitanoj koncentraciji 12,5 µg/mL iznosila je 17607,5 µm², što se statistički značajno ne razlikuje od srednje vrijednosti kontrolne grupe koja je iznosila 16876,4 µm². Statistički značajna razlika vidljiva je i usporedbom koncentracija 50 i 25 µg/mL s najmanjom koncentracijom od 12,5 µg/mL. Iz rezultata je vidljivo kako je ispitani uzorak F4 pozitivno djelovao na bržu regeneraciju repne peraje. To možemo povezati s kemijskim sastavom ispitivanog uzorka makroalge *Cystoseira compressa*. Shaibi i sur. (2022) proveli su istraživanje u kojem su ispitivali antioksidativnu aktivnost ekstrakta smeđe alge *Turbinaria ornata* te djelovanje na regeneraciju repne peraje zebrića. Rezultati su pokazali brzu i statistički značajnu regeneraciju repne peraje tijekom izlaganja ekstraktima u odnosu na kontrolnu grupu. Kemijska analiza ispitivanog ekstrakta *Turbinaria ornata* detektirala je prisustvo spojeva koji su zaslužni za antioksidativno djelovanje (Shaibi i sur., 2022). Stoga, može se pretpostaviti kako




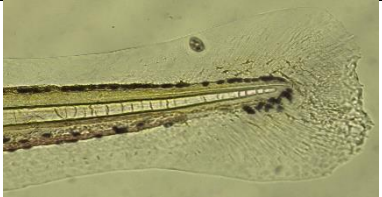


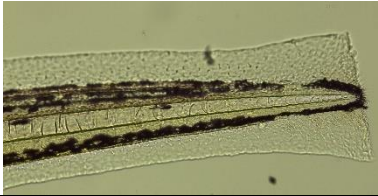

je sposobnost regeneracije repne peraje uslijed izlaganja F4 frakciji smeđe alge *Cystoseira compressa* veća upravo zbog prisutnosti velikog broja bioaktivnih molekula s antioksidativnim djelovanjem što je dovelo do bržeg zacjeljivanja.

F3 frakcija makroalge *Cystoseira compressa* ispitana je u tri koncentracije. To su 12,5, 6,25 i 3,125 $\mu\text{g/mL}$. Ispitane koncentracije nisu pokazale statistički značajno povećanje regeneracije repne peraje u usporedbi s kontrolnom grupom. Zbog zabilježene toksičnosti (vidi poglavlje 4.4.) na višim koncentracijama F3 frakcije nismo bili u mogućnosti ispitati regenerativni potencijal pri 50 i 25 $\mu\text{g/mL}$, što može biti jedno od objašnjenja dobivenih rezultata.



Slika 13. Prikaz regeneracije repne peraje nakon 48 sati od amputacije

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (0 $\mu\text{g/mL}$) označena je * (** < 0,01; *** < 0,0001). Statistički značajna razlika između testiranih koncentracija označena je # (# < 0,05; ### < 0,0001)

Tretman	Koncentracija (µg/mL)	0 hpa	48 hpa
a) Negativna kontrola	0,00		
b) F4 frakcija <i>Cystoseira compressa</i>	50		
	25,0		
	12,5		

Slika 14. Prikaz regeneracije repne peraje u živim ličinkama *Danio rerio* neposredno nakon amputacije (0 hpa) i 48 sati nakon amputacije (48 hpa): a) umjetna voda (negativna kontrola), b) frakcija F4 *Cystoseira compressa* (50 µg/mL, 25,0 µg/mL i 12,5 µg/mL)

5. ZAKLJUČCI

Na temelju određivanja biološkog potencijala dviju frakcija [metanolne (F3) i diklormetanske (F4)] morske makroalge *Cystoseira compressa* može se zaključiti sljedeće:

1. U obje frakcije *Cystoseira compressa* zabilježena je antioksidacijska aktivnost. Kod ORAC metode i DPPH metode, veći antioksidativni potencijal uočen je pri frakciji F3. Razlog tome je veća količina karotenoida fukoksantina detektirana u F3 frakciji. Kod FRAP metode utvrđena je veća antioksidativna aktivnost frakcije F4, što se može povezati s većom koncentracijom feofitina A i B. *In vivo* ispitivanje potvrdilo je antioksidativnu aktivnost F4 frakcije unutar živog modelnog organizma zebrice *Danio rerio*.

2. Kod obje testirane frakcije utvrđena je sposobnost inhibicije kolagenaze. Veći inhibični učinak vidljiv je pri frakciji F3 *Cystoseira compressa*, što se može objasniti kroz veću koncentraciju fukoksantina u odnosu na F4 frakciju.

3. Prilikom provođenja testa embriotoksičnosti na ribama zebricama dokazano je kako niti jedna frakcija nije pokazala kardiotoksični potencijal. Kod frakcije F3 pri koncentracijama 50 µg/mL i 25 µg/mL zabilježen je negativan utjecaj na preživljavanje i razvoj embrija, zbog čega su navedene koncentracije izuzete iz daljnjeg ispitivanja biološke aktivnosti. Razlog primijećenoj toksičnosti može se povezati s većom koncentracijom amida prisutnih u frakciji F3 *Cystoseira compressa*.

4. Pozitivan učinak na regeneraciju amputirane repne peraje uočen je prilikom izlaganja ličinkama zebrice *Danio rerio* diklormetanskoj (F4) frakciji *Cystoseira compressa*, što se može pripisati prisutnosti nekolicine bioaktivnih molekula s antioksidativnim djelovanjem.

5. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem istaknuli su bioaktivni potencijal smeđe makroalge *Cystoseira compressa*. Ova makroalga pruža prirodan i bogat brojnih bioaktivnih spojeva s potencijalom implementacije u prehrambenu i kozmetičku industriju.

6. LITERATURA

- Abdelhamid A, Jouini M, Bel Haj Amor H, Mzoughi Z, Dridi M, Ben Said R i sur. (2018) Phytochemical Analysis and Evaluation of the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Potential of Phlorotannin-Rich Fractions from Three Mediterranean Brown Seaweeds. *Mar Biotechnol* **20**, 60–74. doi: 10.1007/s10126-017-9787-z
- Abu-Ghannam N, Shannon E (2017) Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as functional food. U: Microbial Functional Foods and Nutraceuticals (Gupta, VK, Treichel, H, Shapaval, V, Oliveira, LA, Tuohy, M, ured.), John Wiley & Sons Ltd, UK, str. 39-64.
- Afonso NC, Catarino MD, Silva AMS, Cardoso SM (2019) Brown Macroalgae as Valuable Food Ingredients. *Antioxidants* **8(9)**, 365. doi:10.3390/antiox8090365
- Anonymus 1 < <https://www.inaturalist.org> > Pristupljeno 25.kolovoza 2022.
- Avdesh A, Chen M, Martin-Iverson MT, Mondal A, Ong D, Rainey-Smith S i sur. (2012) Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *J Vis Exp* **2** (69):e4196. doi: 10.3791/4196
- Babić S, Čižmek L, Maršavelski A, Malev O, Pfiieger M, Strunjak-Perović I (2021) Utilization of t6he zebrafsh model to unravel the harmful effects of biomass burning duringAmazonian wildfres. *Sci Rep* **11**, 2527. doi:10.1038/s41598-021-81789-1
- Baylac S, Racine P (2004) Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. *Int J Aromather* **14(4)**, 179–182. doi:10.1016/j.ijat.2004.09.008
- Begum R, Howlader S, Mamun-Or-Rashid ANM, Rafiyuzzaman SM, Ashraf G, Albadrani GM i sur. (2021) Antioxidant and Signal-Modulating Effects of Brown Seaweed-Derived Compounds against Oxidative Stress-Associated Pathology. *Oxid Med Cell Longev* 9974890, 22. doi: 10.1155/2021/9974890
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292
- Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* **28**, 25–30, doi:10.1016/s0023-6438(95)80008-5

- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, Strecker R (2014) The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res* **22**(21), 16247–16261. doi:10.1007/s11356-014-3814-7
- Briegera K, Schiavonea S, Miller Jr., FJ, Krausea KH (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* **142**. doi: 10.4414/smw.2012.13659
- Brownlee I, Fairclough A, Hall A and Paxman J (2012) The potential health benefits of seaweed and seaweed extract. In: Pomin, Vitor H., (ed.) Seaweed: ecology, nutrient composition and medicinal uses. Marine Biology: Earth Sciences in the 21st Century. Hauppauge, New York, Nova Science Publishers, 119-136.
- Catarino M, Silva A, Cardoso S (2018) Phytochemical Constituents and Biological Activities of *Fucus* spp. *Mar Drugs* **16**(8), 249. doi:10.3390/md16080249
- Choi TY, Choi TI, Lee, YR, Choe SK, Kim CH (2021) Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med* **53**(3), 310–317. doi:10.1038/s12276-021-00571-5
- D'Costa A, Shepherd IT (2009) Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish* **6**(2), 169-77. doi: 10.1089/zeb.2008.0562
- Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (2010) *Službeni list europske unije* **15** 82 – 128.
- Dizdaroglu M, Jaruga P (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* **46**(4), 382–419. doi: 10.3109/10715762.2011.653969
- Dominguez H (2013) Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. 80 High Street, Sawston, Cambridge CB22 3HJ, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Dominguez H, Loret EP (2019) *Ulva lactuca*, A Source of Troubles and Potential Riches. *Mar Drugs* **17**(6), 357. doi:10.3390/md17060357
- Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui, M, Katiyar S, Mukhtar H (2001) Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol* **44**(3), 425–432. doi:10.1067/mjd.2001.112919

- Fayad S, Tannoury M, Morin P, Nehmé R (2018) Simultaneous elastase-, hyaluronidase- and collagenase-capillary electrophoresis based assay. Application to evaluate the bioactivity of the red alga *Jania rubens*. *Anal Chim Acta* **1020**, 134–141. doi:10.1016/j.aca.2018.03.004
- Fernando IS, Kim M, Son KT, Jeong Y, Jeon YJ (2016) Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. *J Med Food* **19** (7), 615–628. doi:10.1089/jmf.2016.3706
- Forman HJ, Zhang H (2021) Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* **20**(9), 689–709. doi:10.1038/s41573-021-00233-1
- Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function* doi:10.1039/c8fo01997e
- Fu X, Xue C, Ning Y, Li Z, Xu J (2004) Acute antihypertensive effects of fucoidan oligosaccharides prepared from *Laminaria japonica* on renovascular hypertensive rats. *J Ocean Univ China (Nat Sci)* **34**, 560–564.
- Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD (2013) The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet* **29**(11), 611–620. doi:10.1016/j.tig.2013.07.003
- Generalić Mekinić I, Čagalj M, Tabanelli G, Montanari C, Barbieri F, Skroza D, Šimat V (2021) Seasonal Changes in Essential Oil Constituents of *Cystoseira compressa*: First Report. *Molecules* **26**(21), 6649. doi: 10.3390/molecules26216649
- Gerrard DP, Padovan J (2002) The friction and Wear of Rubber Part 1: Effects of Dynamically Changing Slip Direction and the Damage Orientation Distribution Function. *Rubber Chem Technol* **75**(1): 29-48. doi: 10.5254/1.3547671
- Gouveia SF, Hortal J, Cassemiro FAS, Rangel TF, Diniz-Filho JAF (2013) Nonstationary effects of productivity, seasonality and historical climate changes on global amphibian diversity. *Ecography* **36**,104-113. doi: 10.1111/j.1600-0587.2012.07553.x
- Grbec B, Matic, F, Beg Paklar G, Morović M, Popović R, Vilibić I (2018) Long-term trends, variability and extremes of in situ sea surface temperature measured along the eastern Adriatic coast and its relationship to hemispheric processes. *Pure Appl Geophys* **175** (11), 4031-4046 doi:10.1007/s00024-018-1793-1.

- Gu L, Tian L, Gao G, Peng S, Zhang J, Wu D i sur. (2020) Inhibitory effects of polystyrene microplastics on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. *Environmental Pollution*, 114664. doi:10.1016/j.envpol.2020.114664
- Gupta S, Abu-Ghannam N (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci Tech* **22**, 315–326. doi: 10.1016/j.tifs.2011.03.011
- Guschina IA, Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* **45**(2), 160–186. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.001
- Hentati F, Delattre C, Ursu AV, Desbrières J, Le Cerf D, Gardarin C i sur. (2018) Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Carbohydr Polym* **198**, 589–600. doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.098
- Heo SJ, Jeon YJ (2009) Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *J Photochem Photobiol B* **95**(2), 101-107. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.11.011.
- Hereu B, Mangialajo L, Ballesteros E, Thibaut T (2008) On the occurrence, structure and distribution of deep-water *Cystoseira* (Phaeophyceae) populations in the Port-Cros National Park (north-western Mediterranean). *Eur J Phycol* **43**(3), 263-273.
- Hill DJ, Roy N, Heine RG, Hosking CS, Francis DE, Brown J i sur. (2005) Effect of a low-allergen maternal diet on colic among breastfed infants: a randomized, controlled trial. *Pediatrics* **116**(5), e709-15. doi: 10.1542/peds.2005-0147
- Holdt SL, Kraan S (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food application and legislation. *J Appl Phycol* **23**, 543-597. doi: 10.1007/s10811-010-9632-5
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M i sur. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, **496**(7446), 498–503. doi:10.1038/nature12111
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* **50**, 4437–4444, doi:10.1021/jf0201529.

Hupel M, Lecointre C, Meudec A, Poupart N, Gall EA (2011) Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima*. *J Exp Mar Biol Ecol* **401**(1-2), 36–47. doi:10.1016/j.jembe.2011.03.004

ISO 7346-1:1996 Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]

Issac PK, Guru A, Velayutham M, Pachaiappan R, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Arockiaraj J (2021) Oxidative stress induced antioxidant and neurotoxicity demonstrated *in vivo* zebrafish embryo or larval model and their normalization due to morin showing therapeutic implications. *Life Sciences* **283**, 119864. doi:10.1016/j.lfs.2021.119864

Jayawardena TU, Fernando IPS, Lee WW, Sanjeewa KKA, Kim HS, Lee DS, Jeon YJ (2019) Isolation and purification of fucoidan fraction in *Turbinaria ornata* from the Maldives; Inflammation inhibitory potential under LPS stimulated conditions in *in-vitro* and *in-vivo* models. *Int J Biol Macromol* **131**, 614–623. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.105.

Jerković I, Cikoš A, Babić S, Čižmek L, Bojanić K, Aladić K i sur. (2021) Bioprospecting of Less-Polar Constituents from Endemic Brown Macroalga *Fucus virsoides* J. Agardh from the Adriatic Sea and Targeted Antioxidant Effects *In Vitro* and *In Vivo* (Zebrafish Model). *Mar. drugs* **19**(5), 235, 27 doi:10.3390/md19050235.

Jung KA, Lim SR, Kim Y, Park JM (2013) Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresour Technol* **135**, 182–190. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.025

Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP (2013) Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *J Agric Food Chem* **61**(20), 4667–4675. doi:10.1021/jf400819p

Kossack ME, Draper BW. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*) (2019) *Curr Top Dev Biol* **134**, 119-149. doi: 10.1016/bs.ctdb.2019.02.004.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310. doi: 10.1002/aja.1002030302

Kosanić M, Ranković B, Stanojković T (2015) Biological potential of marine macroalgae of the genus *Cystoseira*. *Acta Biol Hung* **66**(4), 374–384. doi:10.1556/018.66.2015.4.2

Leandro A, Pereira L, Gonçalves AMM (2019) Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Mar Drugs* **18**(1), 17. doi:10.3390/md18010017

Lee H, Park HY, Jeong TS (2021) Pheophorbide a Derivatives Exert Antiwrinkle Effects on UVB-Induced Skin Aging in Human Fibroblasts. *Life (Basel)* **15**;11(2), 147. doi: 10.3390/life11020147.

Lim SJ, Wan Aida WM, Maskat MY, Latip J, Badri KH, Hassan O i sur. (2016) Characterisation of fucoïdan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food Chem* **209**, 267–273. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.058

Lomartire S, Cotas J, Pacheco D, Marques JC, Pereira L, Gonçalves AMM (2021) Environmental Impact on Seaweed Phenolic Production and Activity: An Important Step for Compound Exploitation. *Mar Drugs* **19**(5), 245. doi:10.3390/md19050245

Maeda H, Fukuda S, Izumi H, Saga N (2018) Anti-Oxidant and Fucoxanthin Contents of Brown Alga Ishimozuku (*Sphaerotrìchia divaricata*) from the West Coast of Aomori, Japan. *Mar Drugs* **16**(8), 255. doi:10.3390/md16080255

Mapiye C, Vahmani P, Mlambo V, Muchenje V, Dzama K, Hoffman L, Dugan M (2015) The trans-octadecenoic fatty acid profile of beef: Implications for global food and nutrition security. *Food Res Int* **76**, 992–1000.

Mhadhebia L, Mhadhebic A, Robert J, Bouraoui A (2014) Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Aqueous Extracts of Three Mediterranean Brown Seaweeds of the Genus *Cystoseira*. *Iran J Pharm Sci* **13** (1), 207-220.

Michalak I, Chojnacka K (2014) Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* **15**, 160–176. doi: 10.1002/elsc.201400191

Mikami K, Hosokawa M (2013) Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. *Int J Mol Sci* **14**(7), 13763–13781. doi:10.3390/ijms140713763

Mohapatra L, Pati P, Panigrahy R, Bhattamisra SK. (2013) Therapeutic health booster: seaweeds against several maladies. *Indian J Mar Sci* **42**, 538-546. doi:10.20959/wjpps20176-9447

Nurrochmad A, Wirasti W, Dirman A, Lukitaningish E, Rahmawati A, Fakhrudin N (2018) Effects of Antioxidant, Anti-Collagenase, Anti-Elastase, Anti-Tyrosinase of The Extract and

Fraction From *Turbinaria decurrens* Bory. *Indonesian J Pharm* **29**(4) 188-197.doi: 10.14499/indonesianjpharm29iss4pp188

Nusslein-Volhard C, and Dahm R (2002) Zebrafish: a practical approach. New York: Oxford University Press.

OECD, 2013., Guidelines for Testing of Chemicals, Zebrafish Embryo Toxicity Test, Series on Testing and Assessment No. 179 Organization for Economic Cooperation and Development, OECD, Paris

Pangestuti R, Siahaan EA, Kim SK (2018) Photoprotective Substances Derived from Marine Algae. *Mar Drugs* **16**(11), 399. doi: 10.3390/md16110399.

Pangestuti R, Kim S (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Foods* **3**, 255-266 doi: 10.1016/j.jff.2011.07.001,

Parichy DM (2015) Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLife*, **4**. doi:10.7554/elife.05635

Radman S, Čižmek L, Babić S, Cikoš A, Čož-Rakovac R, Jokić S, Jerković I (2022) Bioprospecting of Less-Polar Fractions of *Ericaria crinita* and *Ericaria amentacea*: Developmental Toxicity and Antioxidant Activity. *Mar drugs* **20**(1), 57, 18 doi:10.3390/md20010057.

Radman S, Cikoš AM, Flanjak I, Babić S, Čižmek L, Šubarić D, Čož-Rakovac R i sur. (2021) Less Polar Compounds and Targeted Antioxidant Potential (*In Vitro* and *In Vivo*) of *Codium adhaerens* C. Agardh 1822. *Pharmaceuticals (Basel)* **14**(9), 944. doi: 10.3390/ph14090944.

Rajapaksha DC, Edirisinghe SL, Nikapitiya C, Dananjaya S, Kwun HJ, Kim CH i sur. (2020) Spirulina maxima Derived Pectin Nanoparticles Enhance the Immunomodulation, Stress Tolerance, and Wound Healing in Zebrafish. *Mar Drugs* **18**(11), 556. doi:10.3390/md18110556

Reshma BS, Aavula T, Narasimman V, Ramachandran S, Essa MM, Qoronfleh MW (2022) Antioxidant and Antiaging Properties of Agar Obtained from Brown Seaweed *Laminaria digitata* (Hudson) in D-Galactose-Induced Swiss Albino Mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 7736378. doi:10.1155/2022/7736378

Ribas L, Piferrer F (2013) The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev Aquac* **5**, 1-32. doi: 10.1111/raq.12041

Rožić S, Puizina J, Šamanić I, Žuljević A, Antolić B (2012) Molecular identification of the brown algae, *Cystoseira* spp. (Phaeophyceae, Fucales) from the Adriatic Sea – preliminary results. *Acta adriat* **53**(3), 447-456.

Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare, Methuen & Co LTD, London, str. 69-146.

Shafik AM, Cifuentes D (2018) Zebrafish as a Tool to Study Congenital Heart Diseases. U: *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine* (Ramachandran S. Vasan i Douglas B. Sawyer, ured.) Elsevier. Amsterdam str.771-778.

Shahreza DF (2016) Oxidative stress, free radicals, kidney disease and plant antioxidants. *Immunopathologia Persa* **3**, e11. 10.15171/ipp.2017.03.

Shaibi KMM, Leeba B, Jamuna S, Babu R (2022) Phytochemical Analysis, In Vitro Antioxidant, and Wound Healing Activities of *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh from Gulf of Mannar, India. *Appl Biochem Biotechnol* **194**(1):395-406. doi: 10.1007/s12010-021-03752-0.

Shi WC, Fang ZB, Li L, Luo LF (2015) Using zebrafish as the model organism to understand organ regeneration. *Sci China Life Sci*, **58**, 343–351, doi: 10.1007/s11427-015-4838-z

Spence R, Fatema MK, Ellis S, Ahmed ZF, Smith C (2007) Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *J Fish Biol* **71**(1), 304–309. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x

Stanojković TP, Konic-Ristic A, Kljajic Z, Grozdanic-Stanisavljevic N, Srdic-Rajic T, Zdunic G, Savikin, K (2014) Antioxidant, antiplatelet and cytotoxic activity of extract of *Cystoseira amentacea* from the coast of Montenegro (South-East Adriatic Sea). *Dig J Nanomater Bios* **9**, 869–880.

Susano P, Silva J, Alves C, Martins A, Gaspar H, Pinteus S i sur. (2021) Unravelling the Dermatological Potential of the Brown Seaweed *Carpomitra costata*. *Mar Drugs* **28**;19(3), 135. doi: 10.3390/md19030135.

Tal TL, Franzosa JA, Tanguay RL (2010) Molecular signaling networks that choreograph epimorphic fin regeneration in zebrafish — a mini-review. *Gerontology* **56**, 231–240. doi: 10.1159/000259327

Thring TS, Hili P, Naughton DP (2009) Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants *BMC Complement Altern Med.* **4**;9, 27. doi: 10.1186/1472-6882-9-27.

Thiyagarasaiyar K, Goh BH, Jeon YJ, Yow YY (2020) Algae Metabolites in Cosmeceutical: An Overview of Current Applications and Challenges. *Ma. Drugs* **18**(6), 323-356. doi: 10.3390/md18060323

Wang Y, Xing M, Cao Q, Ji A, Liang H, Song S (2019) Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Drugs* **17**(3), 183. doi:10.3390/md17030183

Wijesinghe WAJP, Joen YJ (2011) Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive component from brown seaweeds: A review. *Phytochem Rev* **10**(3), 431-443. doi: 10.1007/s11101-011-9214-4

Xu SY, Huang X, Cheong KL (2017) Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Mar Drugs* **15**(12), 388. doi:10.3390/md15120388

Yalcin HC, Amindari A, Butcher JT, Althani A, Yacoub M (2017) Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos. *Dev Dyn* **246**(11), 868-880. doi: 10.1002/dvdy.24497

Zhu XY, Wu SQ, Guo SY, Yang H, Xia B, Li P, Li CQ (2018) A Zebrafish Heart Failure Model for Assessing Therapeutic Agents. *Zebrafish* **15**(3), 243-253. doi: 10.1089/zeb.2017.1546

Zouboulis CC, Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Elewa R, Makrantonaki E (2019) Aesthetic aspects of skin aging, prevention and local treatment. *Clin Dermatol.* doi:10.1016/j.clindermatol.2019.04.002

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (KAROLINA BEGIĆ) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Begić

Vlastoručni potpis