

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

KAROLINA BEGIĆ

**Ispitivanje antioksidativnog potencijala polisaharidnih frakcija makroalgi  
Jadranskog mora upotrebom embrija zebrice *Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi Instituta Ruđer Bošković, u sklopu istraživačkog projekta „Bioprospecting Jadranskog mora“ unutar Znanstvenog Centra Izvrsnosti za Bioprospecting. Rad je izrađen pod voditeljstvom dr.sc. Sanje Babić i prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

## POPIS KRATICA

COBU	<i>Codium bursa</i>
CYBA	<i>Cystoseira barbata</i>
CYCO	<i>Cystoseira compressa</i>
DCF-DA	2',7' -diklorofluorescin diacetat
DMSO	Dimetil sulfoksid
FUVI	<i>Fucus virsoides</i>
HASC	<i>Halopteris scoparia</i>
MS-222	Etil 3-aminobenzoat metansulfonat
PAPA	<i>Padina pavonica</i>
ROS	Reaktivne kisikove vrste; eng. <i>Reactive oxygen species</i>
ULLA	<i>Ulva lactuca</i>
TCA	Trikloroocetna kislina
ZET	Test embriotoksičnosti na zebričama; eng. <i>Zebrafish Embryotoxicity Test</i>

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	4
3. TEORIJSKI DIO .....	5
3.1. Osnovne karakteristike algi .....	5
3.1.1. Smeđe makroalge.....	5
3.1.2. Zelene makroalge .....	9
3.2. Kemijski sastav i biološka aktivnost.....	12
3.2.1. Polisaharidi .....	12
3.2.2. Proteini .....	15
3.2.3. Lipidi .....	15
3.2.4. Pigmenti.....	15
3.2.5. Polifenoli.....	16
3.3. Primjena makroalgi u industrijskoj proizvodnji i značaj u prehrani .....	17
3.4. Oksidativni stres .....	18
3.4.1. Slobodni radikali .....	18
3.4.2. Reaktivne kisikove vrste .....	19
3.5. Antioksidansi i njihova aktivnost .....	20
3.6. Osnovne karakteristike zebrića ( <i>Danio rerio</i> ).....	20
3.6.1. Stadiji embrionalnog razvoja.....	22
3.6.2. Test embriotoksičnosti na zebrićama.....	23
3.6.3. Zakonodavni okviri i načela 3R-a .....	24
4. EKSPERIMENTALNI DIO .....	25
4.1. Uzorkovanje makroalgi.....	25
4.2. Kemikalije i standardi .....	28
4.3. Aparatura i pribor.....	29
4.4. Metode rada.....	29
4.4.1. Ekstrakcija polisaharida .....	29
4.4.2. Održavanje zebrića i mrijest .....	30
4.4.3. Test embriotoksičnosti na zebrićama <i>Danio rerio</i> .....	31
4.4.4. Ispitivanje antioksidativnog potencijala <i>in vivo</i> upotrebom zebriće <i>Danio rerio</i> .....	32
4.4.5. Određivanje udjela sulfatnih grupa polisaharida .....	33
4.4.6. Određivanje udjela L-fukoze u polisaharidima.....	34
4.4.7. Određivanje udjela uronske kiseline .....	34
4.4.8. Statistička obrada podataka .....	34
5. REZULTATI.....	36

5.1. Kemijska analiza polisaharidnih frakcija makroalgi.....	36
5.2. Mortalitet, stopa abnormalnosti i izvaljivanje uslijed izlaganja polisaharidnim frakcijama makroalgi.....	36
5.3. Kardiotoksični potencijal polisaharidnih frakcija makroalgi.....	38
5.4. Neurotoksični potencijal polisaharidnih frakcija makroalgi.....	40
5.5. Zaštitni utjecaj polisaharidnih frakcija makroalgi na stopu preživljavanja ličinki izloženih vodikovom peroksidu.....	42
5.6. Zaštitni utjecaj polisaharidnih frakcija makroalgi na nastanak oksidativnog stresa kod ličinki izloženih vodikovom peroksidu.....	44
6. RASPRAVA.....	47
7. ZAKLJUČCI.....	52
8. ZAHVALE.....	54
9. POPIS LITERATURE.....	55
10. SAŽETAK.....	66
11. SUMMARY.....	67

## 1. UVOD

Morske alge jedan su od gospodarski najperspektivnih organizama na svijetu, čemu svakako doprinosi činjenica da su jedan od najbogatijih izvora funkcionalnih metabolita u morima i oceanima. Funkcionalni metaboliti algi poput polisaharida, proteina, peptida, aminokiselina, lipida, polifenola, pigmenata i mineralnih soli postaju fokus sve intenzivnijih istraživanja upravo zbog porasta svijesti o potrebi uvođenja nutritivno-funkcionalnih sastojaka u prehranu (Xu i sur., 2017). Iz nutricionističke perspektive, morske alge ujedno imaju vrlo nisku energetska, a visoku nutritivnu vrijednost. Sadržaj lipida je nizak, dok je sadržaj ugljikohidrata visok (Xu i sur., 2017). U Aziji je vrlo rasprostranjena primjena morskih algi u prehrani, što se često povezuje s manjim rizikom od pojave kroničnih bolesti poput karcinoma ili kardiovaskularnih bolesti (Xu i sur., 2017). Unatoč prepoznatom potencijalu biomase algi, njihova proizvodnja u Europi trenutno je ograničena nizom tehnoloških, regulatornih i tržišnih barijera. Svemu tome ne ide u prilog ~~ni~~ nedostatak i neusklađenost regulacija i normi vezanih uz njihovu upotrebu u prehrani (Araújo i sur. 2021). Brzinu eksploatacije novih vrsta algi sputavaju kako administrativni protokoli, tako i potreba da svaka nova vrsta prethodno stavljanju na tržište zadovolji Regulacije o tzv. "novoj hrani" (Regulation (EU) 2015/2283). Sve je to rezultiralo činjenicom da se, unatoč iznimnom potencijalu, komercijalno iskorištava tek neznatni udio makroalgi sveprisutnih u vodenim sustavima (Araújo i sur. 2021). Francuska se izdvojila kao prva europska zemlja koja je uspostavila specifičnu procjenu upotrebe određenih morskih algi za prehranu ljudi. Tako se kao hrana, odnosno začini mogu koristiti 22 vrste makroalgi te svega 3 vrste mikroalgi. Među makroalgama je 9 vrsta smeđih morskih algi, 2 vrste zelenih te 11 vrsta crvenih algi (CEVA, 2019). Od 9 navedenih vrsta smeđih algi, njih dvije ispitane su unutar ovog istraživanja (*Fucus virsoides*, *Ulva lactuca*).

Morske alge mogu se svrstati u 3 glavne skupine, a to su smeđe alge (*Phaeophyceae*), zelene alge (*Chlorophyceae*) i crvene alge (*Rhodophyceae*). Svaka od ovih skupina ima karakteristična svojstva i određene biološki aktivne komponente koje su od značaja za žive organizme (Sudhakar i sur., 2018). Struktura i biološka aktivnost bioaktivnih molekula (polisaharida, proteina, lipida, polifenola, pigmenata, vitamina i minerala) ne ovisi samo o vrsti makroalge, već i o uvjetima staništa koji često mogu uključivati širok raspon temperature, hidrostatskog tlaka i saliniteta (Jayawardena i sur, 2020). Jadransko more je posebno izazovno stanište zbog visokog saliniteta (35.0-38.5 ‰) i relativno male dubine (uglavnom do 200 m dubine), što upućuje na povišen utjecaj UVA i UVB zračenja te velikih temperaturnih oscilacija (7-27°C) (Grbec i sur., 2018). Upravo takvi uvjeti rezultirali su stvaranjem brojnih endemskih

vrsta. Dosad je u Jadranskom moru zabilježeno 2.597 vrsta algi, od čega je 152 endema. Smeđa alga *Fucus virsoides* ili jadranski bračić, jedna od smeđih algi istraživana unutar ovog rada pripada endemskim vrstama Jadranskog mora (Grozđanić i sur., 2019).

Usljed promjenjivih/nepovoljnih uvjeta u okolišu dolazi do pojave oksidativnog stresa, tj. neravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa, posljedično uzrokujući oštećenja staničnih procesa (Jayawardena i sur, 2020). Oksidativni stres se eliminira antioksidativnim obrambenim sustavom i to posredstvom mnogih antioksidativnih enzima te ne-enzimskih antioksidansa (Zhong, 2019). Morske makroalge razvile su specifične biomolekule koje inhibiraju ili usporavaju oksidaciju supstrata te na taj način smanjuju nastanak potencijalnih slobodnih radikala i pojavu oksidativnog stresa (Jayawardena i sur, 2020). Upravo je to svojstvo makroalgi postalo jednim od glavnih fokusa kako prehrambene, tako i kozmetičke i farmaceutske industrije. Posljednjih nekoliko godina jednu od značajnijih skupina bioaktivnih molekula čine polisaharidi koji postaju predmetom sve intenzivnijih istraživanja zbog mnogobrojnih farmakoloških aktivnosti poput antioksidativnog, antikancerogenog, antikoagulativnog, imunomodulatornog djelovanja (Jesus Raposo i sur., 2015., Pangestuti i sur., 2018). Njihova biološka aktivnost ovisna je o kemijskoj strukturi, kemijskim svojstvima, vrsti i omjeru monosaharida, značajkama glikozidnih veza, te ovisno o uvjetima u okolišu može varirati čak unutar iste vrste (Xu i sur., 2017). Od značajnijih polisaharida izoliranih iz algi svakako treba izdvojiti ulvan, alginat, karagenan, agar, laminarin, fukoidan (Kraan, 2012). Polisaharidi imaju veliku komercijalnu primjenu te se koriste kao stabilizatori, zgušnjivači, emulgatori, te su sastavni dio hrane za ljudsku i životinjsku konzumaciju te pića (Kraan, 2012). Na primjer, ekstrakti fukoidana iz vrsta smeđih algi *Fucus vesiculosus* i *Undaria pinnatifida* odobreni su u proizvodnji hrane i dodataka prehrani (European Commission 12/2017).

Unatoč iznimnom potencijalu polisaharida izoliranih iz makroalgi, trenutno je vrlo malo sveobuhvatnih studija o antioksidativnoj aktivnosti polisaharida dokazanoj unutar *in vivo* biološkog sustava. Velika potreba za provođenjem takvih sveobuhvatnih studija posebno je naglašena utvrđivanja optimalne efektivne koncentracije za čovjeka, što je moguće isključivo upotrebom modelnih organizama. Dakako, ne smiju se izostaviti toksikološke analize kako bi se uz poželjna svojstva (zdravstvene dobrobiti) ispitala i sigurnost za čovjeka i okolišne organizme. Takav koncept naglašen je i proveden unutar ovog istraživanja.

Zebrica *Danio rerio* (F. Hamilton, 1822) modelni je organizam korišten u ovom radu. Zebrica je trenutno jedan od najperspektivnijih i najučestalije korištenih organizama u brojnim biomedicinskim, toksikološkim te farmakološkim istraživanjima. *In vivo* eksperimenti na zebricama mogu dati korisne informacije o potencijalnoj toksičnosti ispitivane biomolekule na

okolišne organizme i čovjeka (Bambino, 2017). Prema tome, riba zebrica *Danio rerio* postala je nezaobilazan model kralježnjaka za razna istraživanja (Yalcin, 2017). Prednosti uključuju laku genetsku manipulaciju, malu veličinu, nisku cijenu, visok fekunditet, transparentnost tijekom cijelog embrionalnog razvoja (Yalcin, 2017). Također, velika prednost riba zebrica je izrazita genetska podudarnost s genomom čovjeka, zbog čega se rezultati dobiveni na njima vrlo lako mogu ekstrapolirati na sisavce, odnosno ljude (Howe, 2013). Ovo su samo neki od razloga koji su od velikog značaja prilikom upotrebe živog organizma (*in vivo*) u standardiziranom *in vitro* formatu.



## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Glavni cilj ovog istraživanja je provođenje sveobuhvatnog ispitivanja antioksidativne aktivnosti kemijski okarakteriziranih polisaharidnih frakcija dvije zelene alge (*Ulva lactuca* i *Codium bursa*) i pet smeđih algi (*Padina pavonica*, *Halopteris scoparia*, *Cystoseira compressa*, *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides*) Jadranskog mora upotrebom modelnog organizma zebrice *Danio rerio*.

Glavni cilj bit će ostvaren kroz sljedeće aktivnosti:

- a) Određivanje udjela sulfatiranih grupa polisaharida u frakcijama sedam makroalgi;
- b) Ispitivanje toksičnog potencijala polisaharidnih frakcija upotrebom embrija ribe zebrice *Danio rerio* tijekom prvih 96 h razvoja;
- c) Ispitivanje "zaštitnog" učinka polisaharidnih frakcija sedam makroalgi u embrijima zebrice *Danio rerio* na razinu oksidativnog stresa induciranog vodikovim peroksidom tijekom prvih 96 h razvoja.

### 3. TEORIJSKI DIO

#### 3.1. Osnovne karakteristike algi

Alge su heterogena skupina, uglavnom vodenih, fotosintetskih, autotrofnih organizama koji mogu biti jednostanični, višestanični te kolonijalni. Smatra se kako na planeti postoji više od 25.000 vrsta algi. Pripadaju nadcarstvima Procaryota i Eucariota. U okviru nadcarstva Procaryota pripadaju carstvu Monera, a u okviru nadcarstva Eucariota pripadaju carstvima Protista i Vegetabilia. Alge su nastale i razvijale se u vodi pa se tako najveći broj vrsta nalazi upravo u vodenoj sredini (Xu i sur., 2017). Alge koje su se tokom evolucije prilagodile životu izvan vode, nastanjuju vlažna i osvjetljena staništa. Razlikujemo sljedeće vrste algi: alge kremenjašice (Bacillariophyta), zlatnožute alge (Chrysophyceae), svijetleće bičaaše (Dinoflagellata), smeđe alge (Phaeophyceae), zelene bičaaše (Euglenophyta), zelene alge (Chlorophyceae), crvene alge (Rhodophyta) te modrozeleno alge ili cijanobakterije (Cyanobacteria). Zaslužne su za oko 50% fotosintetskih procesa koji se odvijaju na zemlji (Moroney i Ynalvez, 2009). Važna uloga algi očituje se u kružnom ciklusu ugljika, unutar kojeg sudjeluje u uklanjanju viška ugljičnog dioksida iz okoliša. S druge su pak strane, najveći "proizvođači" kisika (Moroney i Ynalvez, 2009).

Alge se dijele na makroalge i mikroalge. Morske alge pripadaju uglavnom makroalgama te nastanjuju litoralnu zonu. Morske makroalge vrlo su perspektivna skupina algi zbog širokog spektra bioloških aktivnosti (Ibañez i sur., 2012). Sadrže velike količine ugljikohidrata (do 60%), srednje količine proteina (10-47%) te vrlo male količine lipida, svega 1-3%. Sadržaj mineralnog pepela je promjenjiv te se kreće od 7 do 38% (Dominguez i Loret, 2019). Koriste se u različitim istraživanjima poput testova toksičnosti (kao pokazatelji stanja okoliša i indikatori zagađenja), bioremedijaciji (pročišćavanju otpadnih voda), genetičkom inženjerstvu i populacijskoj ekologiji (Dominguez i Loret, 2019).

##### 3.1.1. Smeđe makroalge

Smeđe alge (Phaeophyceae; Phaeophyta) su višestanični organizmi razvrstani u šest redova: Ectocarpales, Cutleriales, Sphacelariales, Dictyotales, Laminariales i Fucales. Postoji oko 1.500 do 2.000 vrsta (Kadam i sur., 2013). Oblikom mogu varirati od nitastih, vrpčastih, kožasto-lepezastih do vrpčasto-spljoštenih i dihotomski razgranjenih (Kadam i sur., 2013). Mogu narasti do duljine od 45 m i više. Većina ih se nalazi u hladnijim vodama (Kadam i sur., 2013). Razmnožavanje smeđih algi može biti vegetativno te spolno i nesporno (izomorfna ili

heteromorfna izmjena generacija). Kromatofori smeđih algi sadrže klorofil a te manje klorofila c, beta-karotin i ksantofile. Najčešći polisaharidi prisutni u smeđim algama su alginati, laminarin i fukani. Laminarin ima brojne prednosti, uključujući nisku staničnu toksičnost, biorazgradivost te visoku biokompatibilnost. Smeđim algama se pridaje sve veća pažnja zbog visokog sadržaja strukturno različitih bioaktivnih spojeva, od kojih su neki već implementirani u hranu, lijekove ili pak gnojiva. Studija iz 2015. je dokazala kako fukoidani imaju protuupalne, antioksidativne i gastroprotektivne aktivnosti (Hadj Ammar i sur., 2015). Također, imaju pozitivan utjecaj na mikrobiotu crijeva te imunološki sustav. Niz pozitivnih bioaktivnosti dokazano je i za laminarin, a to su antioksidativno, antitumorsko, antikoagulativno, protuupalno, imunoregulacijsko, antiapoptotsko djelovanje (Sellimi, 2018).

Jadransko more obiluje raznim vrstama smeđih algi od kojih su neke kritično ugrožene. Neke endemske vrste u Mediteranu su *Cystoseira zosteroides*, *Cystoseira spinosa* i *Cystoseira funkii* (Hereu i sur., 2008). U Jadranskom moru poznati je Jadranski bračić (*Fucus virsoides*), ali česte su i vrste drugih rodova poput *Cystoseira*, *Dictyota*, *Padina* i *Sargassum*.

U ovom radu, ispitivali smo bioaktivnosti sljedećih smeđih algi: *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Fucus virsoides*, *Halopteris scoparia* i *Padina pavonica*, koje su detaljnije opisane u nastavku.

*Cystoseira barbata* (Slika 1) je smeđa makroalga koja spada u rod *Cystoseira*. Izvor je bioaktivnih sekundarnih metabolita poput terpenoida, masnih kiselina, triacilglicerola, steroida, florotanina i polisaharida, flavonoida i polifenola (Ibrahim i Abdel-Tawab, 2020). Nastanjuje gornju sublitoralnu zonu na dubini 0,2 m te se nalazi na otvorenim i zaštićenim stjenovitim obalama, poluzatvorenim područjima i obalnim lagunama (Berov i sur., 2012).

#### Znanstvena klasifikacija:

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



**Slika 1.** *Cystoseira barbata* (preuzeto s web stranice: <https://www.inaturalist.org/>).

*Cystoseira compressa* (Slika 2) i druge alge koje pripadaju rodu *Cystoseira* mogu stvoriti različite sekundarne metabolite poput fenolnih spojeva, lipida, vitamina, pigmenata i polisaharida (Hentati i sur., 2018). Smeđe alge koje pripadaju rodu *Cystoseira* nalaze se uz istočnu obalu Atlantika i Mediterana te postoji oko 294 vrsta (Kosanić i sur., 2015). Rezultati studije iz 2015. pokazali su umjereno antioksidativno djelovanje smeđih algi roda *Cystoseira*. Dokazano je kako antioksidativna aktivnost korelira s ukupnim sadržajem fenola u ekstraktima algi. Fenoli su vrlo važni antioksidansi upravo zbog svoje sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala poput hidroksilnih radikala ili superoksida. Međutim, ostala istraživanja dokazala su da antioksidativnu aktivnost mogu uzrokovati i ostali spojevi poput pigmenata (karotenoidi i klorofili), esencijalna ulja te polisaharidi niske molekulske mase (Kosanić i sur., 2015). Posljednjih godina, brojnost algi iz roda *Cystoseira* u značajnom je padu upravo zbog uništavanja njihovog staništa te eutrofikacije u Sredozemnom moru. Vrste smeđih alga koje pripadaju ovom rodu su osjetljive na prisutnost stresa u okolišu, zbog čega se često koriste u procjeni ekološkog stanja. Taksonomija vrsta unutar ovog roda je još uvijek dosta slabo razjašnjena te nema dovoljno studija koje istražuju genetsku raznolikost vrsta u Jadranskom moru (Rožić i sur., 2012).

#### Znanstvena klasifikacija:

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



**Slika 2.** *Cystoseira compressa*

(preuzeto s web stranice:

<https://www.inaturalist.org/>).

*Fucus virsoides* (Slika 3) je endemična vrsta smeđe alge prisutne u Jadranskom moru. Pripada porodici Fucaceae. Prirodni je pokazatelj čistoće mora. Visina talusa se kreće od 20 do 28 cm (Linardić, 1949). Predstavlja važan izvor hrane zbog visoko hranjivih komponenata, složenog sadržaja polisaharida, masnih kiselina i polifenola (Grozđanić i sur., 2019). Dokazano je kako su polifenoli i masne kiseline iz ove vrste alge zaslužne za antikancerogeno i antimikrobno djelovanje (Grozđanić i sur., 2019). *Fucus virsoides* je dobar izvor polinezasićenih masnih kiselina s omjerom (n-6):(n-3) između 1.5:3 što je prihvaćeno kao

uravnotežena vrijednost za ljudsku prehranu (Najdek i sur., 2014). Studija iz 2008. godine pokazala je učinkovitost vrste *Fucus virsoides* u akumulaciji joda iz Jadranskog mora, zbog čega se može koristiti u procjeni taloženja antropogenog joda u Jadranskom moru (Osterc i Stibilj, 2008).

#### Znanstvena klasifikacija:

<b>CARSTVO:</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>KOLJENO:</b>	Ochrophyta
<b>RAZRED:</b>	Phaeophyceae
<b>RED:</b>	Fucales
<b>PORODICA:</b>	Fucaceae
<b>ROD:</b>	Fucus
<b>VRSTA:</b>	<i>Fucus virsoides</i>



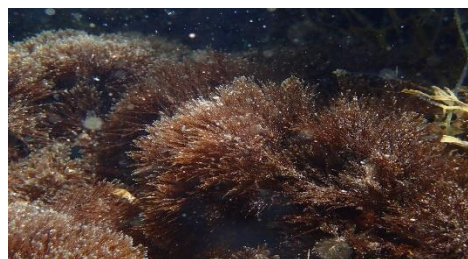
**Slika 3.** *Fucus virsoides*

(preuzeto s web stranice: <https://www.inaturalist.org/>).

*Halopteris scoparia* (Slika 4) je smeđa alga koja pripada obitelji Stypocaulacea. Visina se obično kreće oko 15 cm. Talus je pričvršćen za stijene te tvori krute i razgranate niti. Jedna je od vrsta algi s visokim sadržajem bioloških molekula. Dokazana su njezina antimikrobna i antifungalna aktivnost (Güner, 2019). Studija iz 2019. dokazala je potencijalnu primjenu *Halopteris scoparia* kao preventivno sredstvo u borbi protiv humanog karcinoma (Güner, 2019). Upravo takva djelovanja obećavaju vrlo važno i snažno sredstvo u medicini koje pokazuje širok spektar upotrebe. Može se konzumirati s morskom salatou ili u jelima uglavnom istočnih zemalja (Güner, 2019).

#### Znanstvena klasifikacija:

<b>CARSTVO:</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>KOLJENO:</b>	Ochrophyta
<b>RAZRED:</b>	Phaeophyceae
<b>RED:</b>	Sphacelariales
<b>PORODICA:</b>	Stypocaulaceae
<b>ROD:</b>	Halopteris
<b>VRSTA:</b>	<i>Halopteris scoparia</i>



**Slika 4.** *Halopteris scoparia*

(preuzeto s web stranice: <https://www.inaturalist.org/>).

*Padina pavonica* (Slika 5) je morska smeđa makroalga još poznata kao "paunov rep". Pripada obitelji Dictyotaceae, redu Dictyotales, razredu Phaeophyceae. Nastanjuje umjereno topla i tropska mjesta uključujući Indijski, Tihi i Atlantski ocean, ali i Sredozemno more (Caruana i sur., 2021). Sadrži karakteristične polisaharide koji su prisutni u smeđim algama, a to su laminarin i alginat. Pigmenti pronađeni u ovoj algi su klorofil c1 i c2, fukoksantin, fukoksantol, flavoksantin i diatoksantin (Jerković, 2019). Najzastupljenija masna kiselina je palmitinska kiselina, iza koje slijede oleinska i miristinska kiselina (Jerković, 2019). Bogata je fenolnim spojevima, posebice flavonoidima i taninima. Još jedna važna komponenta u sastavu su ugljikovodici, od čega 69% čine masne kiseline, a 8% steroli, uključujući fukosterol i kolesterol (Caruana i sur., 2021). Studija iz 2021. pokazuje da je ekstrakt ove makroalge učinkovit antiagregator amiloidnih proteina, čime štiti mitohondrijske organele očuvanjem integriteta mitohondrijske membrane (Caruana i sur., 2021).

#### Znastvena klasifikacija:

<b>CARSTVO:</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>KOLJENO:</b>	Ochrophyta
<b>RAZRED:</b>	Phaeophyceae
<b>RED:</b>	Dictyotophycidae
<b>PORODICA:</b>	Dictyotaceae
<b>ROD:</b>	Padina
<b>VRSTA:</b>	<i>Padina pavonica</i>



**Slika 5.** *Padina pavonica* (preuzeto s web stranice:

<https://www.inaturalist.org/>).

#### 3.1.2. Zelene makroalge

Zelene alge (Chlorophyta) čine heterogenu skupinu fotoautotrofnih protoktista koji naseljavaju biosferu (Naselli-Flores i Barone, 2009). To je skupina koja obuhvaća jednostanične oblike koji žive pojedinačno ili u kolonijama te složenije oblike. Razmnožavanje zelenih algi može biti spolno i nesporno (vegetativno, sporama). Vegetativan način razmnožavanja prisutan je kod jednostaničnih zelenih algi, dok se višestanične zelene alge razmnožavaju fragmentacijom talusa. Spolni način razmnožavanja jest gametogamija (Naselli-Flores i Barone, 2009). Zelene alge razvrstane su u devet redova. To su Volvocales, Chlorococcales, Cladophorales, Chaetophorales, Oedogoniales, Siphonales, Conjugales i Charales. Žive u planktonu i bentosu slatkih voda, a rjeđe u moru. Nalaze se u

čistim, oligotrofnim vodama. Nitaste alge mogu biti razgranate ili nerazgranate. Složeniji oblici predstavljaju alge kojima tijelo nalikuje tijelu razvijenih biljaka, odnosno sadrže rizoide, kaluoide te filoide. Postoji od 7.500 do 10.000 vrsta te oko 500 rodova (Naselli-Flores i Barone, 2009). Uglavnom sve vrste zelenih algi sadrže kloroplaste. Kloroplasti sadrže različite pigmente, a to su klorofil a i b, karotenoide poput beta karotena te ksantofile (lutein). Od pigmenata prevladavaju klorofili koji su zaslužni za izrazito zelenu boju. Zelene alge sadrže tilakoide, membransku strukturu povezanu s listovima gdje se odvija reakcija fotosinteze. U ovom radu istraživane su dvije vrste zelenih algi. To su *Codium bursa* i *Ulva lactuca*.

*Codium bursa* (Slika 6) je morska makroalga koja može narasti do 30 cm. Ima baršunastu strukturu te je tamnozeleno boje. Sadrži polisaharide (alfa i beta glukani). Općenito, alge nisu bogate mastima, ali sadrže polinezasićene masne kiseline koje su značajne za zdravlje ljudi. U najvećem udjelu sadrže palmitinsku kiselinu. Također, sadrže i omega-3-masne kiseline poput alfa linolenske masne kiseline. Istraživanje je pokazalo kako neke vrste zelenih algi, uključujući vrstu *Codium bursa*, sadrže masne kiseline s neparnim brojem C atoma poput heptadekanoične (C 17:0) i pentadekanoične kiseline (C 15:0). (Milović i sur., 2019). Neki znanstvenici tvrde da postoji povezanost između masnih kiselina s neparnim brojem C atoma i manjeg rizika od kardiovaskularnih te metaboličkih bolesti. Među omega-6-masnim kiselinama najzastupljenija je linolna kiselina. Linolna kiselina je glavna kiselina koja regulira metabolizam lipoproteina male gustoće (LDL) (Milović i sur., 2019). Steroli predstavljaju važnu komponentu u staničnoj membrani eukariota. Steroli koji se mogu pojaviti u algama su beta-sitosterol, beta-stigmasterol, fukosterol i kampesterol. Fukosterol pokazuje različite biološke aktivnosti, poput antikancerogene, antioksidativne, antihiperlipidemijske aktivnosti te smanjuje koncentraciju kolesterola u krvi. Postoji mnogo izvješća o farmakološkoj aktivnosti kampesterola, ali ponajviše su se istraživale aktivnosti vezane uz snižavanje kolesterola te antikancerogeni učinak. Beta-stigmasterol je prekursor u sintezi kortikoida i spolnih hormona (androgena i estrogena). Uključen je u sintezu vitamina D. Postoje mnoga istraživanja koja su dokazala antimutageno, antioksidativno, protuupalno djelovanje i djelovanje na središnji živčani sustav. Jedini sterol koji je detektiran u vrsti *Codium bursa* jest beta-sitosterol. Pozitivni učinci beta-sitosterola su smanjenje rizika od benigne hiperplazije prostate, sudjelovanje u prevenciji raka debelog crijeva, bolesti srca, modulacija imunološkog sustava. Također, može pomoći u liječenju tuberkuloze, raka vrata maternice, reumatoidnog artritisa i hiperkolesterolemije. (Milović i sur., 2019). Mineralni sastav također varira u ovisnosti o vrsti alga. *Codium bursa* ima visok sadržaj kalija, a nizak sadržaj litija, što pozitivno utječe na pacijente s hipertenzijom (Milović i sur., 2019).

### Znastvena klasifikacija:

<b>CARSTVO:</b>	Eukaryota
<b>KOLJENO:</b>	Chlorophyta
<b>RAZRED:</b>	Ulvophyceae
<b>RED:</b>	Bryopsidales
<b>PORODICA:</b>	Codiaceae
<b>ROD:</b>	Codium
<b>VRSTA:</b>	<i>Codium bursa</i>



**Slika 6.** *Codium bursa* (preuzeto s web stranice : <https://www.inaturalist.org/>).

*Ulva lactuca* (Slika 7) je zelena makroalga, poznata i kao "morska salata". To je polimorfna vrsta, a sama morfologija ovisi o stupnju saliniteta vode ili simbiozi s bakterijama (Dominguez i sur., 2019). Sadrži velik broj makro- i mikro-nutrijenata, a istraživanja ukazuju na njezina antitumorska, antivirusna, antioksidativna, antimikrobna svojstva (Yu-Qing i sur., 2016). Na određenim područjima moguća je kontaminacija teškim metalima, što može biti opasno za ljudsku prehranu (Yaich i sur., 2011). Boja se kreće od svijetlo zelene do tamno zelene. Može doseći duljinu do 18 cm, a širinu čak do 30 cm. Postoji pretpovijesni zapis o liječenju hiperlipidemije, sunčanice i mnogih bolesti urinarnog trakta pomoću ove vrste u obliku dodatka prehrani u kineskoj medicini (Yu-Qing i sur., 2016). Studija iz 2019. dokazala je antioksidativni učinak alge *Ulva lactuca* (Anjali i sur., 2019). Fitokemijska ispitivanja otkrila su prisutnost alkaloida, flavonoida i fenolnih spojeva u ovoj algi (Anjali i sur., 2019). Ovi bioaktivni spojevi su odgovorni za antioksidativno i antibakterijsko djelovanje (Anjali i sur., 2019). Istraživanje koje je provedeno 2018. *in vivo* na miševima pokazalo je pozitivne rezultate u korist ove alge. Ispitivan je hipolipidemijski i kardioprotektrivan učinak *Ulva lactuca* na hiperkolesterolemiju miševa. Suplementacija prehrane miševa ovom makroalgom dovela je do smanjenja razvoja hiperkolesterolemije i srčanih ozljeda kao rezultat prirodno prisutnih antioksidanata poput flavonoida i karotenoida. Suplementacija ovom algom mogla bi biti korisna u sprječavanju srčanih problema i smanjenju rizika od aterogeneze (Kammoun i sur., 2017). Polisaharidi, točnije ulvan, mogu imati kemoprotektrivan učinak protiv karcinogeneze dojke. Ovi preventivni učinci očitavaju se kroz pojačavanje apoptoze, suzbijanja oksidativnog stresa i upale te pojačavanja antioksidativne aktivnosti zbog prisutnih biološki aktivnih tvari (Abd-Elatef i sur., 2017).



### Znastvena klasifikacija:

<b>CARSTVO:</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>KOLJENO:</b>	Chlorophyta
<b>RAZRED:</b>	Ulvophyceae
<b>RED:</b>	Ulvales
<b>PORODICA:</b>	Ulvaceae
<b>ROD:</b>	Ulva
<b>VRSTA:</b>	<i>Ulva lactuca</i>



**Slika 7.** *Ulva lactuca*  
(preuzeto s web  
stranice : <https://www.inaturalist.org/>).

### 3.2. Kemijski sastav i biološka aktivnost

Morske makroalge sadrže niz biološki aktivnih komponenata poput polisaharida, proteina, lipida, polifenola, pigmenata, dijetalnih vlakana, vitamina B skupine, kao i prirodnih spojeva koji djeluju na rast biljnih organa (auksini, giberelini i citokinini) (Michalak i Chojnacka, 2014). Kako bi se zaštitile od drugih organizama, proizvode širok spektar kemijski aktivnih metabolita s različitim biološkim aktivnostima, koji mogu djelovati antimikrobno, antioksidativno, antivirusno, antialergijsko, antikoagulantno te citotoksično (Al-Enazi i sur., 2017, Hentati i sur., 2018, Kosanić i sur., 2015). Zbog toga su svoju primjenu pronašle u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Kosanić i sur., 2015).

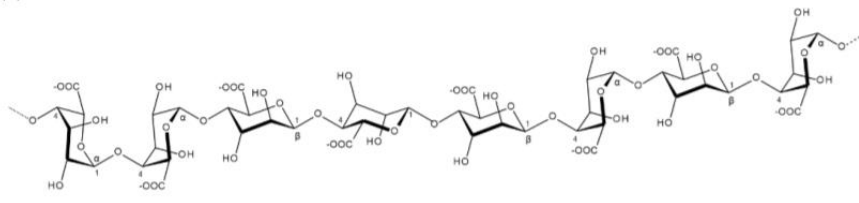
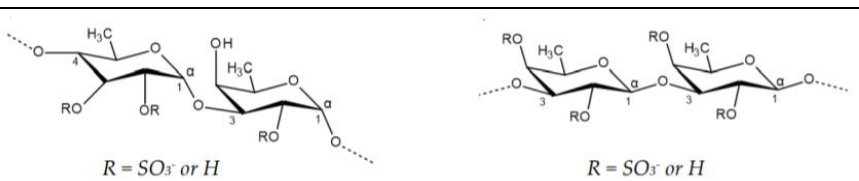
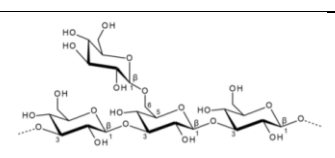

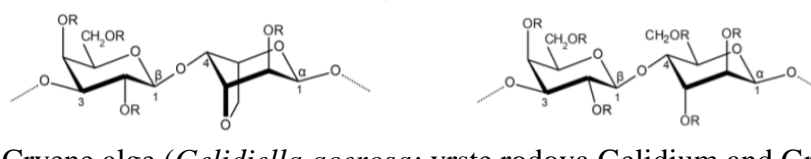
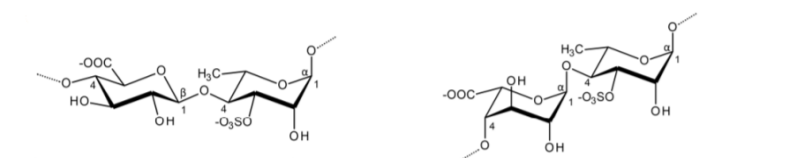
#### 3.2.1. Polisaharidi

Morske alge imaju visok sadržaj polisaharida koji se uglavnom karakteriziraju kao prehrambena vlakna. Morske alge predstavljaju najvažniji izvor sulfatiranih polisaharida biljnog porijekla, a kemijska struktura ovih polimera razlikuje se prema rodu i vrsti algi. Frakcije ugljikohidrata uključuju veliku raznolikost topljivih polisaharida (Dominguez i Loret, 2019). Glavni sulfatirani polisaharidi koji se nalaze u smeđim i crvenim algama su karagenan i fukoidan (Pangestuti i sur., 2018). Ulvan je najznačajniji polisaharid iz zelenih algi. Značajni predstavnici polisaharida iz smeđih algi su alginati, fukani, manitol i laminarin. Polisaharidi prisutni u crvenim algama su karagenan, porfirin, manan i sulfatirani galaktani (Michalak i Chojnacka, 2014, Dominguez i Loret, 2019). Biološke i farmakološke aktivnosti sulfatiranih polisaharida uglavnom su rezultat složene interakcije nekoliko strukturnih značajki. To su broj sulfatnih skupina, njihova raspodjela duž polisaharidne okosnice, molekulska masa, sastav šećera te stereokemija (Jesus Raposo i sur., 2015). Iako se mogu naći neke sličnosti između polisaharida iz svake skupine organizama, oni mogu biti heterogeni i strukturno različiti

(Tablica 1). Do varijacije u strukturi može doći i unutar iste vrste, što predstavlja beskonačan izvor novih bioaktivnih spojeva.

Pozitivna djelovanja koja pokazuju polisaharidi su antikoagulantno, antitumorsko, imunomodulatorno i preventivno djelovanje (Jesus Raposo i sur., 2015). Također, mogu djelovati protuupalno, kao antioksidansi ili antibiotici. Dobra su antilipidemijska i hipoglikemijska sredstva (Jesus Raposo i sur., 2015). Potencijalno mogu djelovati i kardioprotektivno, gastroprotektivno i hepatoprotektivno (Jesus Raposo i sur., 2015). Utjecaj polisaharida na ljudsko zdravlje je raznolik. Međutim, potrebno je provesti više istraživanja o polisaharidima. Treba ispitati toksičnost i bioraspodivnost (Jesus Raposo i sur., 2015). Istraživanje je dokazalo fotoprotektivan učinak karagenana u UVB-induciranim ljudskim keratinocitima. Karagenan štiti od UVB-inducirane apoptoze u keratinocitima te reducira oslobađanje reaktivnih kisikovih vrsta. Smatraju se sigurnim dodacima u mnogim proizvodima farmaceutske, prehrambene i kozmetičke industrije. Fukoidan također pokazuje fotoprotektivan učinak. To je dokazano na modelima humanog kožnog fibroblasta i miševima koji su ozračeni UVB-om (Pangestuti i sur., 2018). Fukoidani niže molekularne mase pokazuju veći fotoprotektivan učinak od visokomolekularnih fukoidana. Razlog tome je što se fukoidane niže molekularne mase apsorbiraju prije zračenja (Pangestuti i sur., 2018). Ulvan može modulirati metabolizam lipida. Dokazano je da smanjuje hiperlipidemiju kod štakora i miševa. Čimbenici koji predstavljaju rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti su niske razine lipoproteina visoke gustoće (HDL), visoke razine lipoproteina niske gustoće (LDL) te povišena koncentracija triglicerida. Polisaharidi iz ulvana mogu smanjiti razinu LDL-a i triglicerida, povećati koncentraciju HDL-a u serumu te na taj način pozitivno utjecati na kardiovaskularni sustav (Lahaye i Robic, 2007). 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.

**Tablica 1.** Osnovna kemijska struktura odabranih polisaharida izoliranih iz morskih makroalgi.

	(a) Osnovna kemijska struktura/strukture <sup>1</sup> i (b) prisutnost u makroalgama	Ref.
<b>Alginat</b>	 <p>(a) (b) Smeđe alge (<i>Laminaria digitata</i>, <i>Laminaria japonica</i>, <i>Macrocystis pyrifera</i>, <i>Saccharina</i> sp.)</p>	(Kraan, 2012)
<b>Fucoidan</b>	 <p>(a) <math>R = \text{SO}_3^- \text{ or } H</math> (b) Smeđe alge (<i>Padina boryana</i>, <i>Fucus vesiculosus</i>, <i>F. evanescense</i>, <i>F. distichus</i>, <i>Saccharina latissima</i>, <i>Laminaria digitata</i>, <i>Chorda filum</i>, <i>Cladosiphon okamuranus</i>, <i>Ascophyllum nodosum</i>, vrste rodova <i>Undaria</i>, <i>Lessonia</i>, <i>Macrocystis</i>, <i>Cladosiphon</i>, <i>Durvillea</i>, <i>Ecklonia</i>, <i>Sargassum</i>)</p>	(Sanjeeva i sur., 2018)
<b>Laminarin</b>	 <p>(a) (b) Smeđe alge (<i>Eisenia bicyclis</i>, vrste roda <i>Ascophyllum</i>, <i>Laminaria</i>, <i>Fucus</i>, <i>Undaria</i>)</p>	(Kraan, 2012)
<b>Karagenan</b>	 <p>(a) (b) Crvene alge (<i>Kappaphycus alvarezii</i>, <i>Eucheuma denticulatum</i>, <i>Chondrus crispus</i>)</p>	(Kraan, 2012)
<b>Agar</b>	 <p>(a) (b) Crvene alge (<i>Gelidiella acerosa</i>; vrste rodova <i>Gelidium</i> and <i>Gracilaria</i>)</p>	(Kraan, 2012)
<b>Ulvan</b>	 <p>(a) (b) Zelena alga (<i>Ulva lactuca</i>)</p>	(Kraan, 2012)

### 3.2.2. Proteini

Alge predstavljaju alternativni izvor proteina. Najpoznatiji izvor proteina među mikroalgama je *Spirulina*. Proteini su važni zbog svog bioaktivnog potencijala te različitih funkcionalnih svojstava. Alge sadrže polisaharidne stijenke koje ograničavaju i otežavaju ekstrakciju proteina iz morskih algi. To može biti razlog ograničene upotrebe proteina i peptida iz algi u komercijalne svrhe (Wijesinghe i Jeon, 2011). Fikobiloproteini su najznačajnija skupina proteina u algama. Imaju hepatoprotektivno, protuupalno i antioksidativno djelovanje te imaju izniman nutritivni i farmaceutski potencijal. Također, ekstrahirani fikobilini se mogu koristiti kao bojila u hrani i kozmetici (Michalak i Chojnacka, 2014).

### 3.2.3. Lipidi

Alge su vrijedan izvor lipida. Uglavnom sadrže polinezasićene masne kiseline poput omega-3 masnih kiselina (eikozapentaenska kiselina-EPA i dokozaheksaenska kiselina-DHA) te omega-6 masnih kiselina ( $\gamma$ -linolenska kiselina-GLA i arahidonska kiselina-AA). Uloga polinezasićenih masnih kiselina za zdravlje čovjeka je vrlo važna zbog njihove antioksidativne, antibakterijske i antifungalne aktivnosti. (Michalak i Chojnacka, 2014). Dugolančanih omega-6 masnih kiselina poput arahidonske kiseline gotovo da i nema u vrstama slatkovodnih algi, dok u morskim vrstama čine samo mali postotak ukupnih masnih kiselina (Guschina i Harwood, 2006). Steroli su također vrlo značajna skupina lipida koja je ekstrahirana iz biomase algi (npr. beta-sitosterol, beta-stigmasterol, fukosterol i kampesterol). Spojevi izolirani iz morskih algi, poput fitosterola mogu prolaziti kroz krv-mozak barijeru i akumulirati se u središnjem živčanom sustavu. Stoga mogu imati neuromodulatorna i neuroprotektivna svojstva (Caruana i sur., 2021). Još jedno važno područje gdje se primjenjuju lipidi algi je proizvodnja biodizela (Michalak i Chojnacka, 2014).

### 3.2.4. Pigmenti

Morske alge predstavljaju održiv i alternativan prirodni izvor pigmenata te se zbog velikog potencijala koriste u industrijske i komercijalne svrhe (Poojary i sur., 2016). Pigmenti mogu imati antioksidativno, antikancerogeno, protuupalno, neuroprotektivno djelovanje (Michalak i Chojnacka, 2014). Također, mogu imati utjecaj na pretilost. Tri osnovne vrste pigmenata prisutnih u morskim algama su karotenoidi, klorofili i fikobiloproteini (Pangestuti i Kim, 2011). Biološke aktivnosti prirodnih pigmenata odnose se na prevenciju brojnih

degenerativnih bolesti. Dodatak pigmenata u hranu i različite nutritivne proizvode dodatno koristi zdravlju organizma. Jednostavan, jeftin i ekološki prihvatljiv proizvodni proces, visoki prinosi ekstrakcije te dostupnost biomase predstavljaju prednost algi u usporedbi s ostalim izvorima biološki aktivnih spojeva (Michalak i Chojnacka, 2014).

Karotenoidi su prisutni u gotovo svim algama. Djeluju kao antioksidansi koji inaktiviraju reaktivne kisikove vrste te kao „sakupljači“ svjetlosne energije. Po strukturi to su linearni polieni (velik broj dvostrukih veza). Klasifikacija karotenoida se dijeli na karotene i ksantofile. Po strukturi karoteni su nezasićeni ugljikovodici, a ksantofili su oksidirani oblici karotena te sadrže kisik. U smeđim algama najpoznatiji predstavnik ksantofila jest fukoksantin (Wijesinghe i Jeon, 2011). Njegova apsorpcija u našem organizmu ovisi o mnogim čimbenicima koji nisu još do kraja objašnjeni (Pangestuti i Kim, 2011). To su npr. količina i vrsta konzumiranih lipida ili dodatni prehrambeni čimbenici poput prehrambenih vlakana. Osim fukoksantina, u smeđim algama zastupljeni su i beta-karoten te violaksantin (Holdt i Kraan, 2011).

Klorofili su zeleni pigmenti pronađeni u svim algama. Po strukturi su supstituirani tetrapiolom s centralno vezanim atomom magnezija; porfirin tetrapiol je dalje esterificiran u diterpenski alkohol, fitol, da se dobije klorofil (Pangestuti i Kim, 2011). Razlikujemo četiri vrste klorofila koji su identificirani u morskim algama. To su klorofil a, klorofil b, klorofil c te klorofil d. Klorofil d je pronađen u crvenim algama (Pangestuti i Kim, 2011). Mnoga istraživanja pokazuju kako je koncentracija klorofila u algama iz uzgoja tri puta veća nego u algama koje nastanjuju otvorena mora. Klorofil a neophodan je za proces fotosinteze jer je sastavni dio tilakoida-membranskih nakupina u kloroplastima gdje se odvija taj proces. Tijekom procesiranja hrane, klorofili se pretvaraju u feofitin, pirofeofitin i feoforbid. Ovi spojevi pokazuju antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Holdt i Kraan, 2011).

Fikobiloproteini su fluorescentni proteini topljivi u vodi. Razlikujemo tri vrste fikobiloproteina, a to su fikocijanini, alofikocijanini i fikoeritrini koji su zastupljeniji u crvenim algama (Pangestuti i Kim, 2011).

### 3.2.5. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti algi. To su bioaktivne tvari podijeljene u nekoliko klasa prema broju fenolnih prstenova i strukturnih veznih elemenata (Pangestuti i sur., 2018). Oni uklanjaju slobodne radikale i vežu ione metala. Utvrđeno je kako djeluju na proteinske kinaze koje su uključene u malignu transformaciju i regulaciju staničnog ciklusa (Grozđanić i

sur., 2019). Identificirani su kao potencijalni agensi protiv karcinoma koji mogu suzbiti agresivni metastazirani karcinom (Grozđanić i sur., 2019). Najzastupljeniji spojevi u algama su fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, katehini i florotanini. Najveće koncentracije florotanina sadrže smeđe alge (Michalak i Chojnacka, 2014).

### 3.3. Primjena makroalgi u industrijskoj proizvodnji i značaj u prehrani

U Aziji, točnije u Kini, Japanu i Koreji morske alge su dio tradicionalne prehrane. Najviše se upotrebljavaju u Japanu (oko 10% njihove ukupne prehrane). U makrobiotičkoj prehrani imaju značajnu ulogu kao izvor minerala i zauzimaju 5% cjelokupne prehrane. U zapadnim zemljama alge se upotrebljavaju kao izvor različitih bioaktivnih molekula koje su implementirane u industriju (lijekovi, nutraceutici, funkcionalna hrana, kozmetički proizvodi). Razvijeni su mnogi dodaci prehrani koji se koriste u obliku tableta, kapsula ili praha u svrhu poboljšanja zdravlja. Važno je naglasiti kako potrošači daju prednost proizvodima prirodnog podrijetla čiji se sastojci ekstrahiraju iz prirodnog izvora kao što su biljke, alge i gljive.

Jedan od industrijski najznačajnijih polisaharida prisutan u smeđim algama jest alginat. Hidrokoloide koji su također prisutni u biomasi algi su karagenani i agar. Njihova primjena je široko rasprostranjena kod tvari za zgrušavanje, sredstva za želiranje ili kao emulgatori. Polisaharidi imaju svojstvo želiranja, što je već dobro poznato i implementirano u industrijski sektor. Alge imaju visok udio vlakana, od 32 do 50% suhe tvari. Također, alge sadrže i neugljikohidrate spojeve koji su korisni u prehrambenoj, kozmetičkoj ili farmaceutskoj industriji. To su proteini, lipidi, fenoli, terpenoidi, vitamini (vitamini A, B1, B3, B5, B6, B9, B12, C, D, E, K te niacin i folna kiselina) i minerali. Vitamin D pronađen je u smeđim algama, a količina vitamina C varira od 3 do 135 mg/100 g svježih algi. Makroelementi koji se nalaze u algama su natrij, kalcij, klor, sulfati i fosfati, a mikroelementi sadržani u njima su jod, bakar, željezo, cink, selen, molibden, fluor, mangan, bor, nikal i kobalt (Dominguez i Loret, 2019). Navedeni spojevi su korisni u prehrani ljudi, ali i životinja (Dominguez i Loret, 2019). Zbog visoke koncentracije kalija, kalcija i magnezija, alge su od velikog značaja za ljudsku prehranu. Također, alge sadrže glutaminsku kiselinu koja služi kao pojačivač okusa. Prehrambena industrija se suočava s problemom rastuće populacije, a alge bi mogle pomoći u rješavanju tog problema. Nutrijenti koji pomažu kod održavanja zdravlja i prevenciji određenih kroničnih bolesti su polisaharidi, proteini, pigmenti, aminokiseline te fenolni spojevi. Trenutno su na tržištu mikroalge *Spirulina* i *Chlorella* te morska alga Kelp (kombinacija osušenih vrsta *Laminaria* i *Ascophyllum*), vrlo popularne zbog svojeg sastava. Morska alga Kelp bogati je

izvor vitamina, minerala, elemenata u tragovima s naglaskom na vitamine E, K i B12 te mineralu jodu. Također sadrži polisaharide, alginat, fukoidin i laminarin. Ovi spojevi imaju sposobnost upiti veliku količinu vode dajući osjećaj sitosti i djelujući blago laksativno. Može poslužiti i kao vitaminsko-mineralni dodatak deficitarnoj prehrani ili kao pomoćno sredstvo pri dijetama za mršavljenje. Sastav algi pomaže pravilan rad metabolizma, daje kvalitetu zubima, kostima, koži i kosi, reguliraju količinu masnoća te poboljšavaju koncentraciju i pamćenje. Uz to, važne su kao alkalna hrana pri čemu štede minerale potrebne za uspostavu kiselinsko-bazne homeostaze. Mora i oceani postaju vrijedne alternative pri proizvodnji vrijedne biomase koja je usporediva s kopnenim usjevima zbog smanjenja raspoloživih resursa kopna i slatkih voda. Zato su makroalge uzgajane u kontroliranim i održivim sustavima perspektivna varijanta za opskrbu tržišta nutritivno bogatom biomasom (Dominguez i Loret, 2019).

U prošlosti, morske alge su se koristile kao lijek za liječenje bolesti povezanih s kožom, poput atopijskog dermatitisa (Thiyagarasaiyar i sur., 2020). Danas je njihova upotreba u kozmetičkoj industriji od velikog značaja zbog visokog sadržaja proteina, minerala, vitamina i masnih kiselina (Goswami, 2015). Imaju anticelulitno djelovanje, protuupalno svojstvo, potiču obnovu oštećenih stanica kože i povećavaju elastičnost i gipkost kože (Mohapatra i sur., 2013). Ekstrakti morskih algi koriste se u proizvodima za čišćenje, toniranje, hidrataciju kože, losionima i kremama za zaštitu od UV zračenja, gelovima za čišćenje i piling kože, pripravcima za pomlađivanje kože te imaju hidratizirajući učinak na kosu. Današnje spoznaje ukazuju da su smeđe alge najviše pridonijele razvoju kozmetičkih proizvoda, a slijede ih crvene alge, mikroalge te zelene alge (Thiyagarasaiyar i sur., 2020).

### 3.4. Oksidativni stres

#### 3.4.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su svaka kemijska vrsta koja u vanjskoj ljusci posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona zbog čega su vrlo reaktivni. Nastaju kontinuirano u aerobnim živim organizmima 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). Slobodni radikali koji nastaju kao produkti normalnog metabolizma u organizmu imaju vrlo važnu fiziološku ulogu. Međutim, zbog njihove velike reaktivnosti potrebno je imati pod kontrolom nastajanje istih. Nestabilni radikali mogu napasti stanične strukture i uzrokovati oštećenja proteina, DNA i

lipida. Oštećene stanične strukture više ne vrše svoje fiziološke važne funkcije (Dizdaroglu i Jaruga, 2012).

### 3.4.2. Reaktivne kisikove vrste

Reaktivne kisikove vrste (ROS) imaju presudnu ulogu u fiziološkim i patofiziološkim procesima. Reaktivne kisikove vrste mogu biti neutralne molekule poput vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ioni poput superoksidnog aniona ( $\text{O}_2^-$ ) ili radikali poput hidroksilnog radikala ( $\text{OH}^\cdot$ ). Dijelimo ih na slobodne radikale i aktivne neradikalne derivate kisika. U slobodne radikale spadaju superoksid-radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidroksil-radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ) i peroksil-radikal ( $\text{ROO}^\cdot$ ). U aktivne neradikalne derivate kisika spadaju vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hipokloritna kiselina ( $\text{HOCl}$ ) i singletni kisik ( $\text{O}_2$ ). Singletni kisik nema svojstva radikala, ali zbog svojih spinskih svojstava je jako reaktivan. U visokim koncentracijama vrlo lako reagiraju s proteinima, lipidima, ugljikohidratima i nukleinskim kiselinama uzrokujući nepovratne funkcionalne promjene (Brieger i sur., 2012). Poznato je da ROS-ovi mogu uništavati bakterije i ljudske stanice, ali mnoga istraživanja su pokazala nove uloge ROS-ova vezano za zdravlje i bolesti. Visoke koncentracije uzrokuju oštećenja i negativno utječu na organizam, dok niske do srednje koncentracije reguliraju kaskadne reakcije u stanicama. Biološka specifičnost uvjetovana je količinom, trajanjem i lokalizacijom proizvodnje ROS-ova. ROS u normalnim uvjetima ima presudnu ulogu u fiziološkim procesima poput redoks regulacije fosforilacije proteina, ionskih kanala i transkripcijskih faktora. Potrebni su za biosintetske procese poput proizvodnje hormona štitnjače i umrežavanje u izvanstanični matriks (Brieger i sur., 2012). Međutim, važna je ravnoteža između homeostaze i stanja oksidativnog stresa što ovisi o brzini razgradnje i proizvodnje ROS-a. (Brieger i sur., 2012). Biološki sustavi prepoznaju vrstu i količinu reaktivnih kisikovih vrsta. Organizmi su razvili metode korištenja ROS-ova u kritičnim fiziološkim procesima. Reguliraju rast, apoptozu i signale na staničnoj razini. Prirodna antioksidativna obrana čovjeka uglavnom nije dovoljna za održavanje odgovarajuće ravnoteže reaktivnih kisikovih vrsta. Oksidativni stres uključen je u patologiju bolesti povezanih s oksidacijom kao što su karcinom, kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza i reumatoidni artritis. Oksidacijski stres može biti povezan i s neurodegenerativnim bolestima te procesima starenja (Wang i sur., 2019). ROS-ovi utječu na razvoj raznih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Za bolesti koje su uzrokovane viškom ROS-ova, dodatak antioksidansa nije pokazalo učinkovito djelovanje. Razlog tome je što je djelovanje antioksidansa u tom slučaju zakašnjelo, previše nespecifično, a stoga i nedovoljno učinkovito (Brieger i sur., 2012).



Akumulacija visokih koncentracija ROS-ova utječe na starenje kože i nastanka nekih vrsta karcinoma (Pangestuti i sur., 2018).

### 3.5. Antioksidansi i njihova aktivnost

Antioksidansi su molekule koje doniraju elektron ili vodikov atom reaktivnom slobodnom radikalu te im je glavna zadaća neutralizirati njegovo djelovanje. Prilikom neutralizacije ne postaju nestabilni i nisu podložni daljnjoj oksidaciji. Na taj način štite ljudski organizam od potencijalnih bolesti koje su uzrokovane slobodnim radikalima te smanjuju oksidativni stres. Djelovanje antioksidanata može se opisati na više načina. Inhibiraju prooksidativne enzime, djeluju sinergistički s drugim antioksidansima, hvataju singletni kisik, usporavaju reakcije oksidacije slobodnih radikala, inhibiraju stvaranje slobodnih lipidnih radikala i prekidaju propagaciju autooksidativnih lančanih reakcija. Primjeri antioksidansa su vitamin C, vitamin E, vitamin A, beta-karoten, likopen, lutein, selen, mangan, zeaksantin, polifenoli, flavonoidi, flavoni, katehini i fitoestrogeni (Brieger i sur., 2012). Svi ovi fitonutrijenti nalaze se u biljnim namirnicama. Svaki antioksidans ima različitu funkciju. Epidemiološke studije upućuju na povezanost prehrane bogate antioksidansima s nižom stopom razvoja bolesti povezane s nastankom slobodnih radikala (Brieger i sur., 2012).

### 3.6. Osnovne karakteristike zebrica (*Danio rerio*)

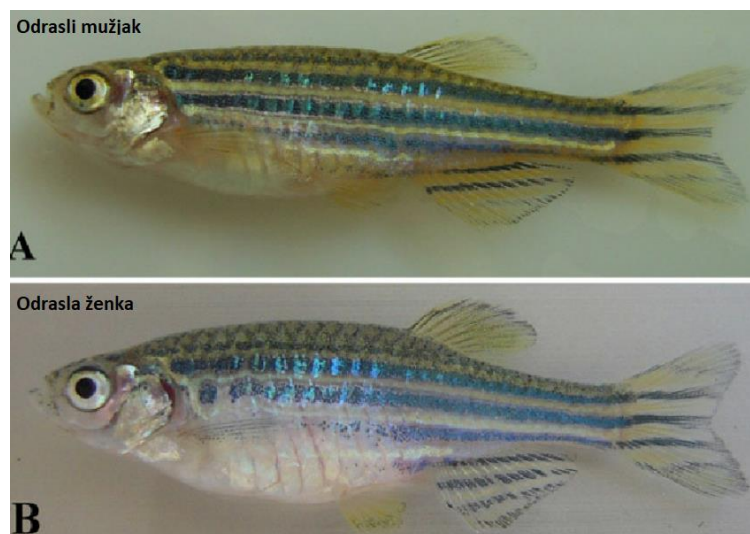
#### Znanstvena klasifikacija:

<b>CARSTVO:</b>	<b>Animalia</b>
<b>KOLJENO:</b>	Chordata
<b>RAZRED:</b>	Actinopterygii
<b>RED:</b>	Cypriniformes
<b>PORODICA:</b>	Cyprinidae
<b>ROD:</b>	Danio
<b>VRSTA:</b>	<i>Danio rerio</i> , Hamilton, 1822

Zebrice *Danio rerio* su tropske slatkovodne ribe, porijeklom iz Indije. U Europu su unijete 1905. godine. Najčešće se nalaze u vodama Nepala, Bangladeša, Pakistana i Myanmara (Parichy, 2015; Spence i sur., 2008). Obitava u plitkim, mirnim vodama, ribnjacima, usporenim

potocima i poljima riže. Zebrice su egzotermne životinje stoga se unutar laboratorija uzgajaju unutar temperaturnog raspona od 27 - 28 ° C. U divljini zebrice naseljavaju različita staništa od 18 ° C do preko 38 ° C .

Zebrica je ime dobila po svojem specifičnom izgledu. Tijelo zebrice karakterizira svjetlosiva boja i 4 vodoravne pruge tamnije sive boje koje se protežu od škržnih poklopaca pa sve do repa (Slika 8). Prisutan je spolni dimorfizam kod odraslih jedinki. Ženke su veće te imaju zaobljeni bjelkasti trbuh (Kossack i Draper, 2019). Drugi pouzdan pokazatelj je dimorfna boja analne peraje i trbuha (Kossack i Draper, 2019). Ribe zebrice sadrže ksantofore, pigmentne stanice koje tvore žutu traku koja se nalazi između crnih pruga koje tvore melanofori (Kossack i Draper, 2019). Ksantofori su prisutni i kod mužjaka i kod ženki, međutim mužjaci proizvode mnogo više žutog pigmenta. Zbog toga djeluju žućkastiji nego ženke (Kossack i Draper, 2019). Prosječna duljina tijela je 5 cm. Tijelo ribe zebrice je izduženo s kratkom i šiljastom glavom, ispod koje su nakrivljena, podignuta usta. Parna prsna i neparna dorzalna peraja postavljene su posteriorno, kako bi omogućile ubrzano kretanje.



**Slika 8.** *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (Prilagođeno prema Avdesh i sur., 2012)

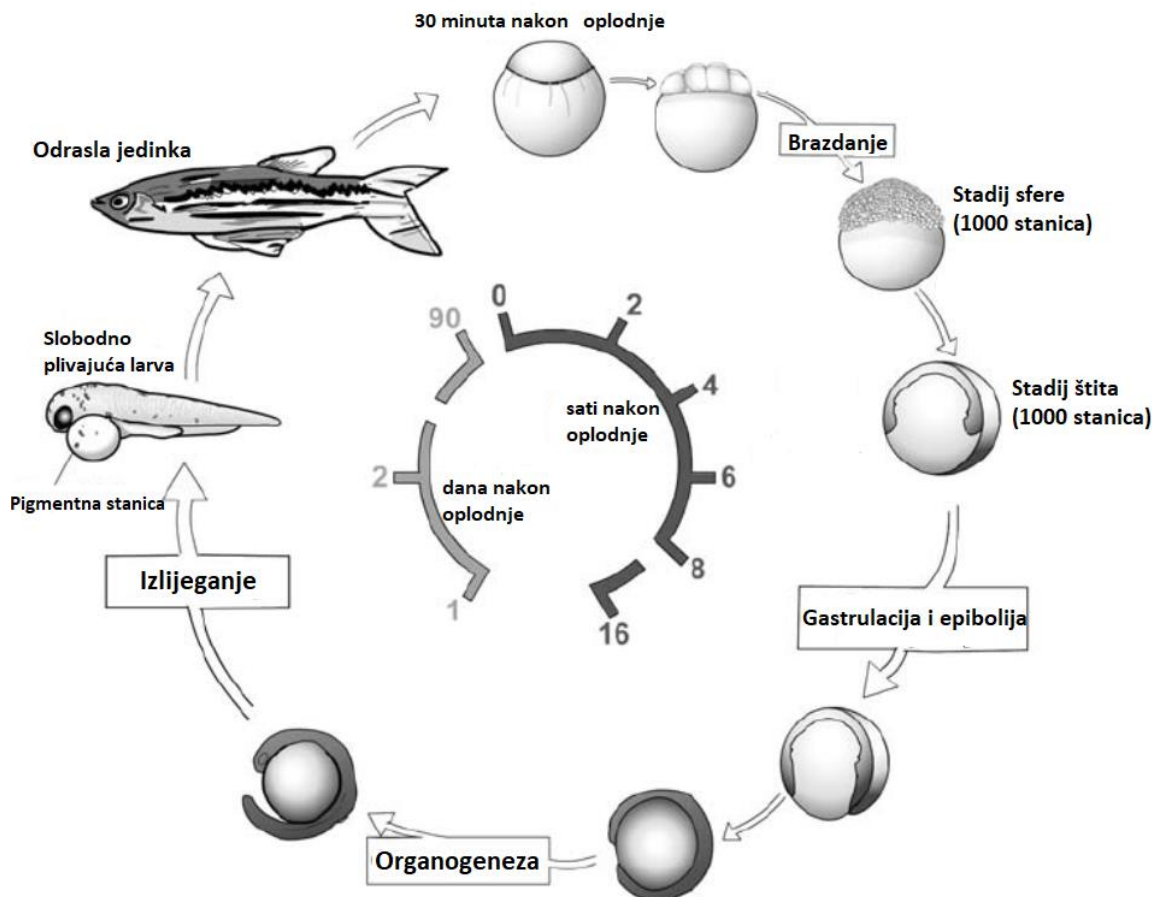
Karakteristike su sljedeće: živahne, brze, lake za uzgoj i razmnožavanje, a u posljednjih 20 godina su postale vrlo popularne u znanstvenim područjima. Zebrice su se tako počele postupno uzdizati kao jedan od najčešće korištenih organizama za biološka i biomedicinska istraživanja. Glavne prednosti ovog modelnog organizma su jednostavna građa organizma te prisutnost osnovnih staničnih procesa koje imaju složeniji organizmi, kratko vrijeme generacije (2-3 mjeseca), *ex utero* razvoj, laka manipulacija i održavanje, kao i prozirnost zebrice tijekom

cijelog embrionalnog razvoja (Ribas i Piferrer, 2013). Ima sposobnost regeneracije kože, peraja, srca i mozga tijekom svojih ličinačkih stadija (Nusslein-Volhard i sur., 2002).

Hrane se zooplanktonima, malim insektima, algama i drugim biljnim vrstama. Životni vijek u zatočeništvu kreće se od 3 do 5 godina. Sekvenciranjem genoma utvrđeno je kako zebrice s ljudima dijele 70% gena. 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). Zebrice imaju zatvoreni kardiovaskularni sustav i srčani ciklus koji uvelike podsjeća na kardiovaskularnu fiziologiju čovjeka. Osim što pomažu kod određivanja i ispitivanja kardiovaskularnih bolesti, neki modeli počinju odgovarati na temeljna pitanja povezana s aterosklerozom, kardiomiopatijom te aritmijama (Shafik i Cifuentes, 2018).

### 3.6.1. Stadiji embrionalnog razvoja

Zebrice karakterizira visok fekunditet. Kada se nalaze u svojim prirodnim staništima, zebrice pokazuju jasnu sezonalnost u reprodukciji s mrijestom koje započinje neposredno prije početka monsuna (Spence i sur., 2008). U laboratorijskim uvjetima, zebrice su izgubile sezonalnost te je moguća reprodukcija tijekom cijele godine svakih nekoliko dana (Spence i sur., 2008). Par zebrica može dati od 100 do 400 embrija po mrijestu. Oplodnja je stapanje muške i ženske spolne stanice. Dobiveni oblik naziva se zigota te sadrži dvostruki broj kromosoma ( $2n$ ). Definirano je nekoliko embrionalnih stadija kod riba zebrica. To su stadij zigote, stadij dioba, stadij blastule, stadij gastrule, stadij segmentacije, stadij faringule te stadij izleganja (Slika 9). Tijekom cijelog embrionalnog razvoja jedinka je transparentna, što omogućuje uvid u razvoj organa (Kimmel i sur., 1995). Izvaljivanje ličinaka (napuštanje koriona) odvija se u periodu od 48.-96. sata embrionalnog razvitka. U toj fazi dolazi do brzog razvoja prsnih peraja, čeljusti i škrga. Također, dolazi i do razvitka arterija i vena. Nakon 96 sati ličinka je duga oko 3,5 mm te ima gotovo završenu morfogenezu. Ličinka kreće s aktivnim plivanjem, pomiče očima, perajama te čeljusti što omogućava hranjenje i bijeg od predatora (Kimmel i sur., 1995). U ličinačkom stadiju ostaje idućih 27 dana.



**Slika 9.** Razvojni ciklus ribe zebrice. (Prilagođeno prema D'Costa i Shepherd, 2009)

### 3.6.2. Test embriotoksičnosti na zebricama

Test embriotoksičnosti (eng. *Zebrafish Embryotoxicity Test*, ZET; OECD 236, 2013) izvorno je zamišljen kao alternativa za test akutne toksičnosti ribe. ZET je optimiziran, standardiziran i validiran te usvojen kao pouzdan test za procjenu toksičnosti (Braunbeck i sur., 2014). Trenutno je jedan od najčešće korištenih testova u toksikološkim istraživanjima uključujući i pojedinačne kemijske spojeve, tako i okolišne uzorke. Ovim testom prate se letalni i subletalni učinci testiranog spoja u najranijim razvojnim stadijima do 120. sata nakon oplodnje. Prestanak rada srca, koagulacija embrija, neodvajanje repa od žumanjčane vrećice te odsustvo formiranja somita smatraju se letalnim učincima (Zhu i sur., 2018). Subletalni učinci manifestiraju se kroz niz promjena poput skolioze, nastanka perikardijalnog edema ili edema u području žumanjčane vrećice, usporenost razvoja i slično. Također, ZET test moguće je proširiti dodatnim krajnjim učincima od interesa, stoga se mogu pratiti razne fiziološke promjene poput

stope izvaljivanja, kardiotoksičnosti neurotoksičnosti, aktivnosti ABC transportnih proteina, razine oksidativnog stresa, itd.

Ograničenja ZET testa su malobrojna i tiču se spojeva s vrlo velikom molekulskom masom (većom od 3 kDa) koji ne mogu proći korion. Prilikom provođenja takvog tipa istraživanja potrebno je mehanički ukloniti. Postoje ograničenja i kada je u pitanju sposobnost biotransformacije u radnim embrionalnim fazama te je dokazano da su neki neurotoksični spojevi manje toksični za ribe zebrice tijekom njihovog embrionalnog razvoja u usporedbi s odraslim stadijem (Braunbeck i sur., 2014). Usprkos tome, ZET se pokazao kao izvrstan alat za određivanje toksičnosti različitih kemijskih spojeva (Braunbeck i sur., 2014). Nadalje, brojni znanstveni radovi ukazali su na korisnost upotrebe embrija zebrice *Danio rerio* u svrhu ispitivanja bioaktivnosti spojeva izoliranih iz morskih organizama, što je ujedno bio i razlog odabira ovog modelnog organizma u svrhu ovog istraživanja (Braunbeck i sur. 2014).

### 3.6.3. Zakonodavni okviri i načela 3R-a

Načelo 3R temelji se na principu: zamjenjivanja životinja (eng. *Replacement*), smanjivanja broja jedinki (eng. *Reduction*) i poboljšanja metoda u svrhu dobrobiti životinja (eng. *Refinement*) (Russell i Burch, 1959). Embriji zebrice u potpunosti slijede i zadovoljavaju 3R načela, s posebnim naglaskom na etičke principe pri samom testiranju. Prema Direktivi o zaštiti životinja koje se koriste u laboratorijske svrhe (Directive, 2010/63/EU) zebrice do 120 sati nakon oplodnje (eng. hours post fertilization; hpf) ne podliježu zakonskoj regulativi. Zbog racionalizacije i smanjenja broja korištenih jedinki dolazi do smanjenog korištenja odraslih sisavaca kao modelnih organizama. Time se smanjuje patnja velikog broja sisavaca. Zbog transparentnosti embrija tijekom cijelog embrionalnog razvoja omogućena je primjena sličnih procedura kao na sisavcima na ne-invazivan ili manje invazivan način. ZET test osmišljen je kao alternativa akutnom testu toksičnosti na ribama jer omogućava bolju primjenu 3R principa (Braunbeck i sur., 2014).

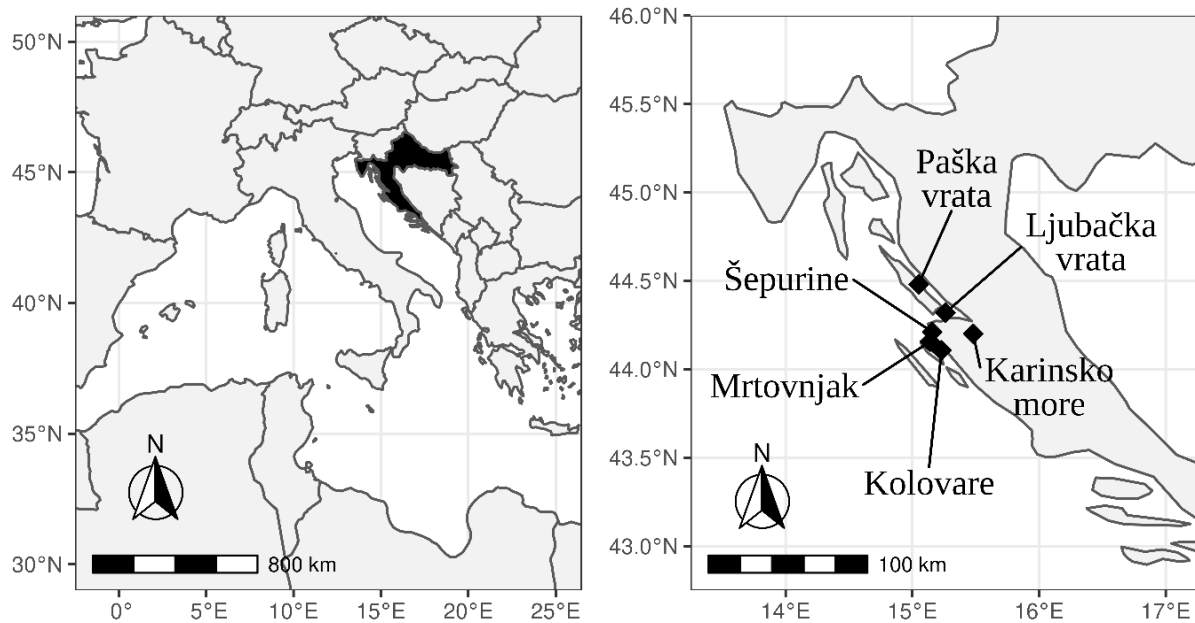
## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### 4.1. Uzorkovanje makroalgi

Za provedbu ovog istraživanja uzorkovano je sedam makroalgi, pet vrsta smeđih makroalgi - *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Fucus virsoides*, *Halopteris scoparia*, *Padina pavonica* te dvije vrste zelenih makroalgi - *Codium bursa* i *Ulva lactuca*. Alge su uzorkovane u obalnom području Zadra i Dugog otoka (Slika 10) od strane licenciranog ronioca i inženjera biologije Donata Petricioli. Unutar tablice 2 detaljnije su opisane koordinate lokacija, datum uzorkovanja, kao i kratica svakog organizma koja će biti korištena kroz tekst u nastavku.

*Fucus virsoides* strogo je zaštićena vrsta temeljem Pravilnika o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine, br. 144/13 i 73/16). Prethodno njenom uzorkovanju, od strane Ministarstva zaštite okoliša i energetike Republike Hrvatske dobiveno je Riješenje (KLASA: UP/I-612-07/18-48/18-48/162, URBROJ: 517-05-1-1-18-6) kojim se Institutu Ruđer Bošković, Zagreb dopušta istraživanje vrste *Fucus virsoides*, što uključuje odsijecanje dijelova steljki s tisuću jedinki na području sjevernog Jadrana u okviru provođenja istraživanja unutar projekta BioProspecting Jadranskog mora na platformi Znanstvenog Centra Izvrsnosti BioProCro.

Prikupljeni uzorci pohranjeni su u prienosni hladnjak zbog očuvanja svoje biološke aktivnosti te transportirani u laboratorij na daljnju obradu. Po zaprimanju u laboratorij, makroalge su temeljito isprane destiliranom vodom kako bi se uklonila morska sol i nečistoće. Nakon toga makroalge su podvrgnute liofilizaciji kroz 24 h koristeći CoolSafe 55-9 PRO liofilizator (Labogene, Danska). Nakon liofilizacije, biomasa je usitnjena u tarioniku.



**Slika 10.** Prikaz lokacije uzorkovanja. Karta je napravljena upotrebom R programa.

**Tablica 2.** Popis prikupljenih uzoraka

<b>LOKACIJA</b> (geografske koordinate)	<b>DATUM</b> <b>UZORKOVANJA</b>	<b>NAZIV</b> <b>UZORKOVANE</b> <b>MAKROALGE</b>	<b>KRATICA</b>
<b>Mrtovnjak</b> (43°42'23"N 15°32'08"E)	25.05.2018.	<i>Codium bursa</i>	COBU
<b>Šepurine</b> (44°12'42"N 15°09'23"E)	13.12.2018.	<i>Cystoseira barbata</i>	CYBA
<b>Kolovare I</b> (44°06'26"N 15°13'54"E)	13.04.2018.	<i>Cystoseira compressa</i>	CYCO
<b>Karinsko more</b> (44°12'02"N 15°28'51"E)	11.12.2018.	<i>Fucus virsoides</i>	FUVI
<b>Kolovare II</b> (44°07'00"N 15°14'00"E)	22.05.2019.	<i>Halopteris scoparia</i>	HASC
<b>Kolovare II</b> (44°07'00"N 15°14'00"E)	22.05.2019.	<i>Padina pavonica</i>	PAPA
<b>Kolovare II</b> (44°07'00"N 15°14'00"E)	22.05.2019.	<i>Ulva lactuca</i>	ULLA



## 4.2. Kemikalije i standardi

**Tablica 3.** Popis korištenih kemikalija.

Ime (kratica)	Kemijska formula	Proizvođač (registarski broj)
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	LabExpert, Ljubljana, Slovenija (CAS 67-56-1)
Dimetil sulfoksid (DMSO)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	Kemika, Zagreb, Hrvatska (CAS 67-68-5)
Vodikov peroksid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Alkaloid, Skopje, Makedonija (CAS 7722-84-1)
2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCF-DA)	C <sub>24</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 4091-99-0)
Etil 3-aminobenzoat metansulfonat (MS-222)	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> · CH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 886-86-2)
Kalcij klorid dihidrat	CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	Emsure, Darmstadt, Njemačka (CAS 10035- 04-8)
Magnezij sulfat	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska (CAS 10034-99- 8)
Natrijev hidrogenkarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	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 suflat	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska (CAS 7778-80-5)
Natrijev tetraborat	Na <sub>2</sub> (B <sub>4</sub> O <sub>5</sub> (OH <sub>4</sub> )) · 8H <sub>2</sub> O	Acros Organics, Belgija (CAS 1303-96.4)
L-cistein	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	Acros Organics, Belgija (CAS 52-90-4)
Trikloroctena kiselina (TCA)	C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Fisher Scientific, UK (CAS 76-03-9)
Barij klorid	BaCl <sub>2</sub>	Abcr GmbH, Njemačka (CAS 10326-27-9)
m-hidroksifenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 580-51-8)
Klorovodična kiselina	HCl	TKI Hrastnik, Slovenija (CAS 7647-01-0)
Natrijev hidroksid	NaOH	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS 1310-73-2)

### 4.3. Aparatura i pribor

**Tablica 4.** Popis korištenih instrumenata.

Naziv instrumenta	Model i proizvođač
Invertni mikroskop	Olympus CKX41, s pripadajućom digitalnom kamerom Leica EC3 i LAS EZ 3.2.0 softverom za analizu slike
Fluorescentni svjetlosni mikroskop	Olympus BX51 s digitalnom kamerom DP70 i Microsoft® AnalySISSoft Imaging System Software-om
Stereomikroskop	Stereomikroskop S6E, Leica stereomicroscope
Inkubator	Phoenix Instrument Incubator TIN-IN35
Ultrazvučna kupelj	Sonorex digiplus, Bandelin, Njemačka
ZebTEC samoregulirajući sustav za uzgoj zebrića s Active Blue tehnologijom	Tecniplast S.p.A., Bugugiate, Italy
Mrijestilica	iSpawn-S Benchtop Size Breeding System (Tecniplast S.p.A.)

### 4.4. Metode rada

#### 4.4.1. Ekstrakcija polisaharida

U svrhu pripreme polisaharidnih frakcija 6 g liofiliziranog uzorka obrađeno je s 50 mL acetona uz stalno miješanje na magnetnoj mješalici tijekom 18 h na sobnoj temperaturi. Cilj je bio dobiti visok prinos polisaharida. Ostatak koji je zaostao nakon filtracije je odvojen te osušen na zraku preko noći. Otprilike 3 g suhog ostatka miješalo se 3 h na 80 °C uz dodatak 50 mL 0.1 M sumporne kiseline. Nakon filtracije, polisaharidi su istaloženi dodatkom 100 mL apsolutnog etanola te pohranjeni preko noći u hladnjaku (+4°C). Istaloženi polisaharidi su sakupljeni te nakon centrifugiranja (5.500 rpm, 15 minuta) sušeni narednih 48 h. Prinos ekstrakcije polisaharida (% PS) izračunat je prema jednadžbi [1] gdje je WP težina dobivena nakon taloženja etanola, a WO težina organizma korištena u svakom eksperimentu.

$$\% \text{ PS} = (\text{WP}/\text{WO}) \times 100 \quad [1]$$

#### 4.4.2. Održavanje zebrića i mrijest

Kao modelni organizam unutar ovog istraživanja korištena je riba zebrića *Danio rerio*, divlji WIK soj, dopremljena iz Europskog resursnog centra, Instituta za tehnologiju Karlsruhe (KIT) u Njemačkoj. Odrasle jedinke zebrića održavane su u ZebTEC samoregulirajućem sustavu s Active Blue tehnologijom (Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italija) pri kontinuiranim periodima dana i noći 14:10 h. Parametri vode su vrlo strogo kontrolirani - temperatura:  $27,00 \pm 0,09$  °C, vodljivost:  $494,80 \pm 2,61$   $\mu\text{S}/\text{cm}$  te pH vrijednost:  $7,60 \pm 0,08$ . Zasićenost otopljenog kisika iznosila je  $\geq 95\%$ . Odrasle zebriće hranjene su tri puta dnevno smrznutim račićima *Artemia* sp. (PETRA-AQUA tropical fish wholesale, Češka).

Dan prije postavljanja eksperimenta odrasle jedinke zebrića prebačene su u mrijestilicu (iSpawn-S Benchtop Size Breeding System (Tecniplast S.p.A.)) u omjeru 2:1 (mužjaci:ženke). Zebriće su u mrijestilici odvojene pregradom. Idući dan ujutro, odmah po paljenju svjetla unutar akvarijske jedinice pregrada je uklonjena, čime su mužjaci i ženke spojeni. Odmah zatim platforma za mrijest se podignula kako bi imitirala prirodne uvjete u okolišu i time je inicirala mrijest. Na dnu platforme nalazi se mrežica koja omogućuje propadanje jajašaca tijekom mrijesta, sprječavajući time konzumaciju jajašaca od strane roditeljskih zebrića. Nakon 30 minuta od mrijesta, jajašca su prikupljena pomoću sita (promjer oka: 800  $\mu\text{m}$ ) te isprana vodom iz akvarijskog ZebTEC sustava kako bi se uklonile nečistoće (Babić i sur., 2021).



**Slika 11.** a) ZebTEC samoregularajući sustav za uzgoj zebrica s Active Blue tehnologijom (Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italy) unutar kojeg se odvija uzgoj i održavanje zebrica (lijevo) i b) Mrijestilica iSpawn-S Benchtop Size Breeding System (Tecniplast S.p.A.) koja se koristila za mrijest zebrica.

#### 4.4.3. Test embriotoksičnosti na zebricama *Danio rerio*

Kao prva faza ovog istraživanja proveden je standardizirani test embriotoksičnosti (OECD 236, 2013) na embrijima zebrice *Danio rerio* u trajanju od 96 h kako bi se utvrdile koncentracije polisaharidnih frakcija koje ne uzrokuju negativan učinak na embrionalni razvoj. U tu svrhu prah polisaharidnih frakcija otopljen je u deioniziranoj vodi upotrebom ultrazvučne kupelji, nakon čega je svaki uzorak razrijeđen u 3 koncentracije – 1,0, 0,5 i 0,25 mg/mL. Prilikom pripreme razrijeđenja korištena je umjetna voda (eng. *artificial water*, AW), koja se ujedno koristila i kao negativna kontrola prilikom testa embriotoksičnosti. Umjetna voda pripravljena je otapanjem 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 ( $\text{NaHCO}_3$ ) i 5.5 mg/L kalij klorida (KCl). Nadalje, uzorci su aerirani (zasićeni kisikom) i temperirani na 27.5 °C.

Oplođena jajašca zebrice (4 - 64 blastomere) odvojena su od neoplođenih i/ili oštećenih upotrebom stereomikroskopa (Leica). Kako bi spriječila mogućnost razrijeđivanja uzorka, ali i što prije započelo s izlaganjem, embriji su prebačeni u Petrijeve zdjelice koje su sadržavale

testirani uzorak. Odmah zatim, embriji su raspoređeni u polietilenske pločice s 24 jažice (NEST Scientific, SAD). Svaka jažica sadržavala je 10 embrija u 1 mL uzorka. U svrhu ispitivanja embriotoksičnosti upotrijebljeno je 10 embrija u 4 replike, što iznosi 40 embrija po ispitanoj koncentraciji. Kontrolni embriji (n=40) izloženi su umjetnoj vodi.

Rubovi pločica su omotani parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje. Pločice s izloženim embrijima su inkubirane na  $27.5 \pm 0.5$  °C (Phoenix Instrument inkubator TIN-IN35). Nakon 96 h razvoja praćeno je preživljavanje, pojava abnormalnosti te stopa izvaljivanja ličinaka iz koriona. Također, ispitana je kardiotoksičnost te neurotoksičnost. Kardiotoksičnost je ispitana na način da su se brojali otkucaji srca kod 15 nasumično odabranih jedinki unutar 15 sekundi. Neurotoksičnost je ispitana na način da se mjerio broj pokreta prsnih peraja kod 10 nasumično odabranih jedinki unutar 20 sekundi.

#### 4.4.4. Ispitivanje antioksidativnog potencijala *in vivo* upotrebom zebrice *Danio rerio*

Koncentracije polisaharidnih frakcija koje unutar testa embriotoksičnosti nisu pokazale toksični potencijal, odabrane su za daljnje ispitivanje antioksidativnog potencijala *in vivo* upotrebom zebrice *Danio rerio*. Prema prethodno opisanom protokolu (poglavlje 4.4.3.) embriji su izloženi testiranim koncentracijama polisaharidnih frakcija (predtretman) u periodu od 2 h. Nakon 2 h, embriji (n=40 embrija po jažici) su izloženi 1 mL mješavine testirane polisaharidne frakcije i 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kao pozitivna kontrola (n=40 embrija) korišten je 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok je, kao i unutar poglavlja 4.4.3. kao negativna kontrola (n=40 embrija) korištena umjetna voda. Ploče s embrijima su inkubirane na  $27.5 \pm 0.5$  °C u inkubatoru u periodu od 96 h.

Ispitivanje se sastojalo od tri tretmana: 1. embriji izloženi vodikovom peroksidu (pozitivna kontrola), 2. embriji izloženi mješavini polisaharidne frakcije i vodikovog peroksida i 3. embriji izloženi umjetnoj vodi (negativna kontrola).

Nakon 96 h razvoja, ličinke su izložene 10 μM koncentraciji DCF-DA. Nakon unosa u stanicu i u prisustvu ROS-ova, DCF-DA oksidira u fluorescentnu boju 2'7'-diklorofluorescein (DCF). Stvorena fluorescencija izravno je proporcionalna količini oksidiranog DCF-DA do DCF. Ličinke su inkubirane 1 h u mraku kako bi se spriječila fotodegradacija fluorescentnog supstrata. Nakon inkubacije od 1 h, ličinke su tri puta isprane umjetnom vodom zbog uklanjanja fluorescentne boje s površine tijela jedinki. Ličinke su zatim anestetizirane s 0,03% MS-222 te promatrane pomoću fluorescencijskog svjetlosnog mikroskopa Olympus BX51 upotrebom zelenog fluorescentnog filtera. Slike su digitalno prikazane i obrađene (dodana mjerna skala) pomoću pripadajuće digitalne kamere DP70 te Microsoft® AnalySIS Soft softvera za obradu

slika. Antioksidativni potencijal polisaharidnih frakcija očitavao se u smanjenju intenziteta fluorescence kod jedinki izlaganoj mješavini polisaharida i  $H_2O_2$  u odnosu na jedinke izlagane samo  $H_2O_2$ . Jačine fluorescence kvantificirane su upotrebom ImageJ softvera (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).



**Slika 12.** a) Stereomikroskop S6E, Leica (lijevo) i b) Petrijeva ploča s jajašcima dobivenima unutar jednog mrijesta (desno).

#### 4.4.5. Određivanje udjela sulfatnih grupa polisaharida

Za određivanje udjela sulfatnih grupa polisaharida izvagano je 8 mg svakog uzorka. Uzorak je otopljen u 3 mL klorovodične kiseline te ostavljen 5 sati na  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon 5 sati dodano je 3,8 mL trikloroctene kiseline (TCA) i 1 mL  $BaCl_2$  želatinastog reagensa. Nakon 15 minuta izmjerena je absorbancija na 360 nm (Dobrinčić i sur., 2021). Rezultati su izraženi kao postotak sulfatnih grupa u suhom ekstraktu.

#### 4.4.6. Određivanje udjela L-fukoze u polisaharidima

Udio jedinica L-fukoze određen je kolorimetrijski s L-cisteinom koristeći L-fukozu kao standard. Za svaki uzorak uzet je alikvot 1 mL (1 mg/mL), dodano je 4,5 mL razrijeđene sumporne kiseline (1:6, H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) te stavljeno u vodenu kupelj 10 minuta na 100 °C. Nakon toga, uzorci su ohlađeni na ledu 5 minuta. Zatim je dodano 100 µl otopine L-cisteina s klorovodičnom kiselinom. Nakon 30 minuta izmjerena je absorbancija na 396 nm i 427 nm (Dobrinčić i sur., 2021). Rezultati su dobiveni pomoću baždarnog dijagrama (0,05-0,175 mg/mL L-fukoze) te izraženi kao postotak fukoze u suhom ekstraktu.

#### 4.4.7. Određivanje udjela uronske kiseline

Za određivanje udjela uronske kiseline izvagano je 5 mg uzorka te pomiješano s 1 mL sumporne kiseline (Melton i Smith, 2005). Uzorci su stavljani u ledenu kupku na magnetnu miješalicu 5 minuta. Taj postupak ponovljen je još jednom sa dodatkom sumporne kiseline te dva puta s vodom. Slijepa proba pripremljena je na način da je dodano samo 1 mL sumporne kiseline. Sadržaj svake epruvete dopunjen je do 10 mL te centrifugirano na 10 minuta. U 400 µl uzorka dodano je 40 µl mješavine sulfamske kiseline i kalijeva sulfamata (4M) (pH 1.6) i 2.4 mL natrijeva tetraborata u otopini sumporne kiseline (75Mm). Uzorci su stavljani 20 minuta u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon što su se uzorci ohladili dodano je 80 µl otopine m-hidroksifenola u dvije epruvete jednog uzorka, a u treću epruvetu istog uzorka dodano je 80 µl Natrijeva hidroksida (0.5%) Izmjerena je absorbancija nakon 15 minuta na 525 nm. Baždarni dijagram je napravljen pomoću D-galakturonske kiseline (5-40 µg/ µl) (Dobrinčić i sur., 2021). Rezultati su izraženi kao postotak uronske kiseline u suhom ekstraktu.

#### 4.4.8. 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 fluorescence kvantificiran je pomoću programa ImageJ.



## 5. REZULTATI

### 5.1. Kemijska analiza polisaharidnih frakcija makroalgi

Udio fukoze najveći je u frakciji *Padina pavonica* (20.51%), a najmanji u frakciji *Halopteris scoparia* (5.41%) (Tablica 5). Najveći udio sulfatnih grupa sadrže frakcije smeđih algi *Cystoseira compressa*, *Fucus virsoides*, *Halopteris scoparia* i *Padina pavonica*. Najmanji udio sulfatnih grupa imaju frakcije zelenih algi *Codium bursa* i *Ulva lactuca* (Tablica 5). Udio uronske kiseline najveći je u frakciji *Cystoseira compressa* (8.45%), a najmanji udio sadrži frakcija *Codium bursa* (0.81%) (Tablica 5).

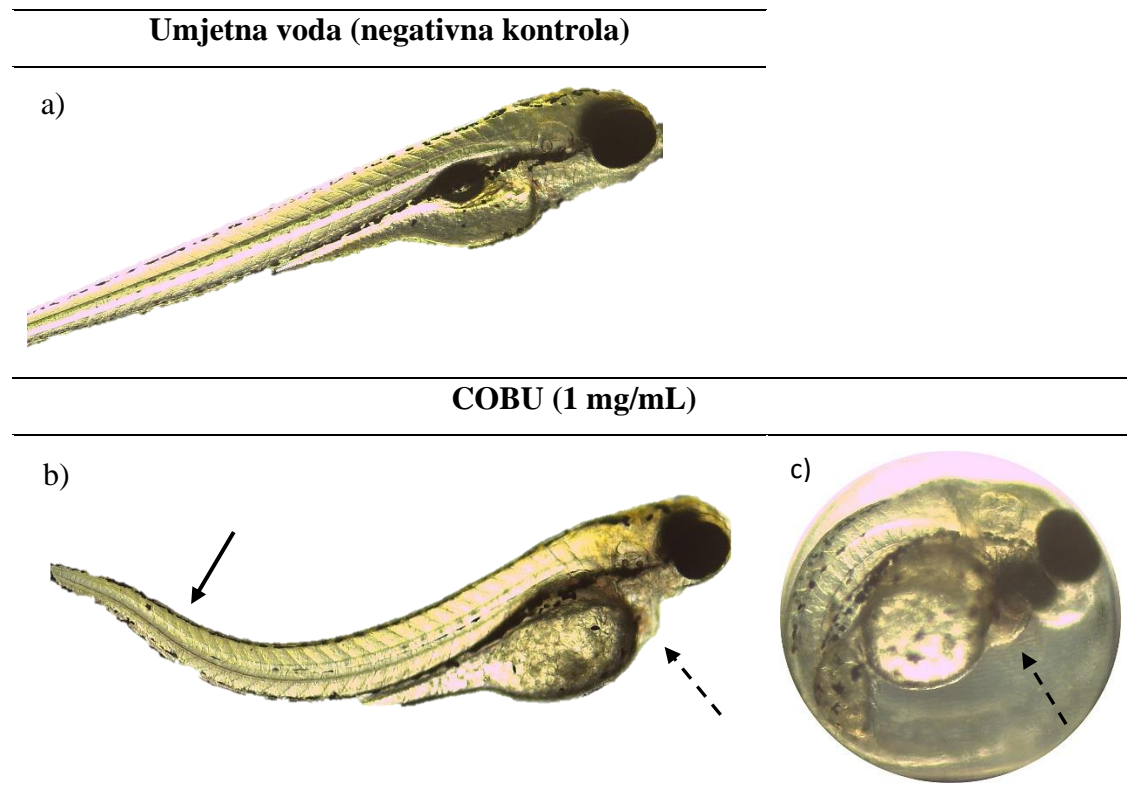
**Tablica 5.** Prikaz udjela fukoze, sulfatnih grupa i uronske kiseline u ispitivanim frakcijama.

Tretman	Fukoza (%)	Sulfatne grupe (%)	Uronska kiselina (%)
COBU	6,35±0,20	26,97±2,90	0,81±0,63
ULLA	8,22±0,20	33,55±4,20	2,03±0,04
CYBA	8,81±0,77	36,40±2,48	7,13±2,03
CYCO	7,80±0,14	95,17±15,36	8,45±1,03
FUVI	7,37±0,10	71,86±7,81	7,51±0,75
HASC	5,41±0,14	70,47±7,50	2,90±0,34
PAPA	20,51±0,91	72,93±2,76	6,73±1,33

### 5.2. Mortalitet, stopa abnormalnosti i izvaljivanje uslijed izlaganja polisaharidnim frakcijama makroalgi

Tijekom izlaganja embrija zebrice *Danio rerio* frakcijama makroalgi *Ulva lactuca*, *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Fucus virsoides*, *Halopteris scoparia* te *Padina pavonica* pri testiranim koncentracijama (0.25, 0.50 i 1.00 mg/mL) nije došlo do statistički značajnog porasta stope mortaliteta, kao niti stope abnormalnosti (<10%; Tablica 6). Frakcija *Codium bursa* pri koncentraciji 1.00 mg/mL uzrokovala je porast stope mortaliteta na 41.66%, dok niže koncentracije 0.50 i 0.25 mg/mL nisu izazvale mortalitet veći od 5% (Tablica 6). Pri koncentraciji 1.00 mg/mL frakcije *Codium bursa* došlo je do blagog porasta stope abnormalnosti (8.33%), iako ne statistički značajnog ( $p>0.05$ ). Najčešći subletalni učinci zabilježeni tijekom izlaganja embrija frakciji 1 mg/mL *Codium bursa* su skolioza (Slika 13, b)

i perikardijalni edem (Slika 13, c). Tijekom izlaganja embrija zebrice testiranim uzorcima nije došlo do značajnog smanjenja stope izvaljivanja u odnosu na kontrolnu skupinu, osim prilikom izlaganja frakciji *Codium bursa* u koncentraciji 1.00 mg/mL (41.67% jedinki napustilo je korion do 96. sata od oplodnje; Tablica 6). Zebrice unutar kontrolne skupine nisu pokazale pojavu razvojnih abnormalnosti (Slika 13, a).



**Slika 13.** Prikaz razvojnih abnormalnosti embrija *Danio rerio* tijekom 96 sati izlaganja frakciji *Codium bursa* (1.00 mg/mL): a) normalno razvijena ličinka u kontrolnoj skupini, b) skolioza (puna strelica) i perikardijalni edem (isprekidana strelica), c) perikardijalni edem (isprekidana strelica)

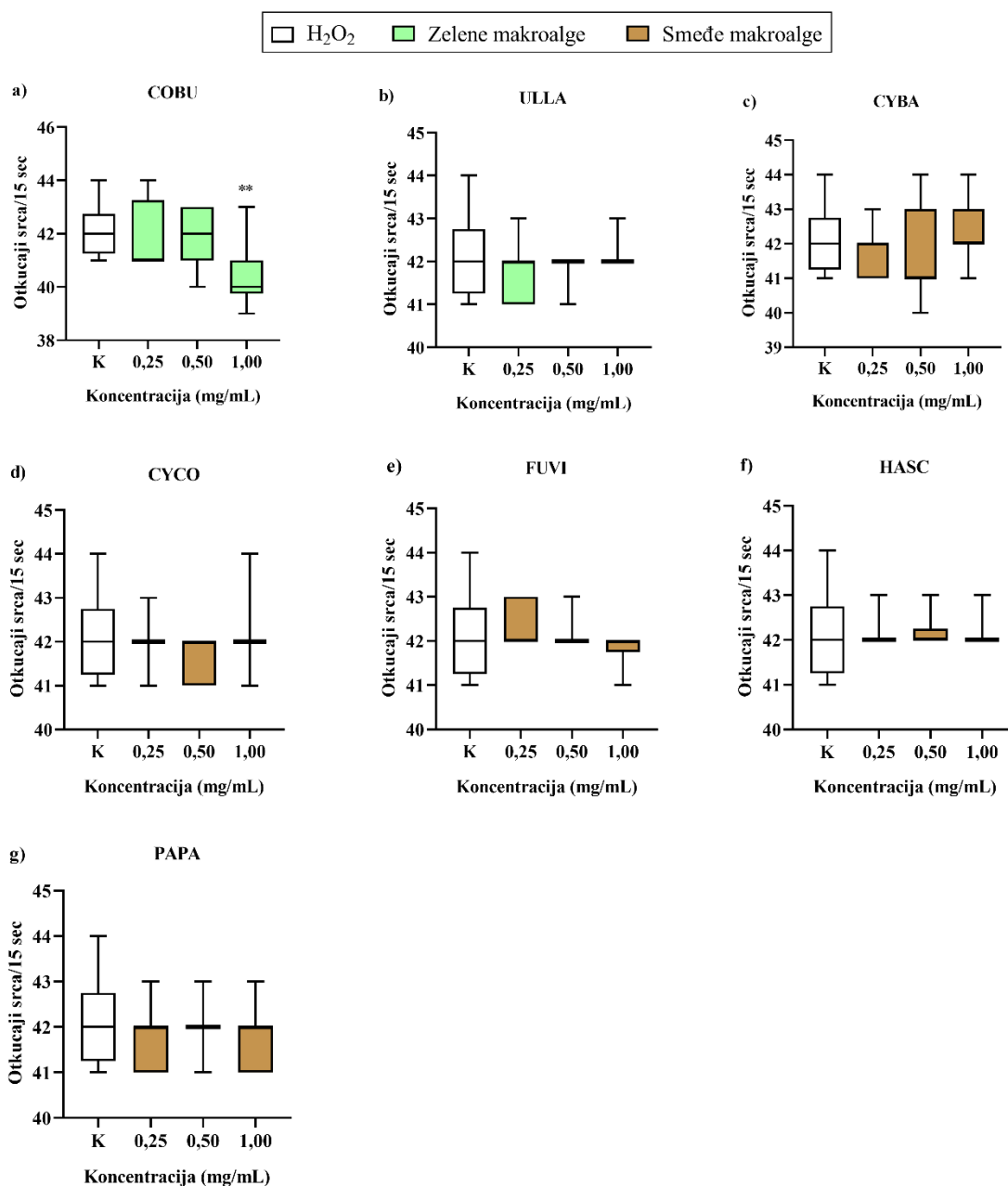
**Tablica 6.** Stopa mortaliteta, abnormalnosti i izvaljivanja embrija 96. sat nakon oplodnje. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Tretman	mg/mL	Mortalitet (%)	Stopa abnormalnosti (%)	Stopa izvaljivanja (%)
Umjetna voda	0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
COBU	1,00	41,66 $\pm$ 41,94	8,33 $\pm$ 16,67	41,67 $\pm$ 50,00
	0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,25	5,00 $\pm$ 10,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
ULLA	1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	95,00 $\pm$ 10,00
	0,50	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 10,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
CYBA	1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	90,00 $\pm$ 11,55
	0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	95,00 $\pm$ 10,00
	0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	95,00 $\pm$ 10,00
CYCO	1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
FUVI	1,00	5,00 $\pm$ 10,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
HASC	1,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 10,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,50	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 10,00	95,00 $\pm$ 10,00
	0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
PAPA	1,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 10,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,50	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 10,00	100,00 $\pm$ 0,00
	0,25	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 10,00	95,00 $\pm$ 10,00

### 5.3. Kardiotoksični potencijal polisaharidnih frakcija makroalgi

U periodu od 96 sati nakon oplodnje kod 15 nasumično odabranih ličinaka pratila se stopa otkucaja srca unutar 15 sekundi. Testirane koncentracije (0.25, 0.50 i 1.00 mg/mL) polisaharidnih frakcija makroalgi *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Fucus virsoides*, *Halopteris scoparia*, *Padina pavonica* i *Ulva lactuca* nisu izazvale smanjenje otkucaja srca *Danio rerio* u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 14). Prema tome, gore navedene frakcije u testiranim koncentracijama ne pokazuju kardiotoksičan učinak. Tijekom izlaganja zebrića 1.00 mg/mL frakcije *Codium bursa* uočeno je statistički značajno smanjenje stope otkucaja srca (40.30 $\pm$ 1.16 otkucaja srca/15 sec, p=0.0013), u odnosu na kontrolnu grupu (42.06 $\pm$ 0.85 otkucaja srca/15 sec; Slika 14). Upravo zbog primjećene embriotoksičnosti (Tablica 6, Slika

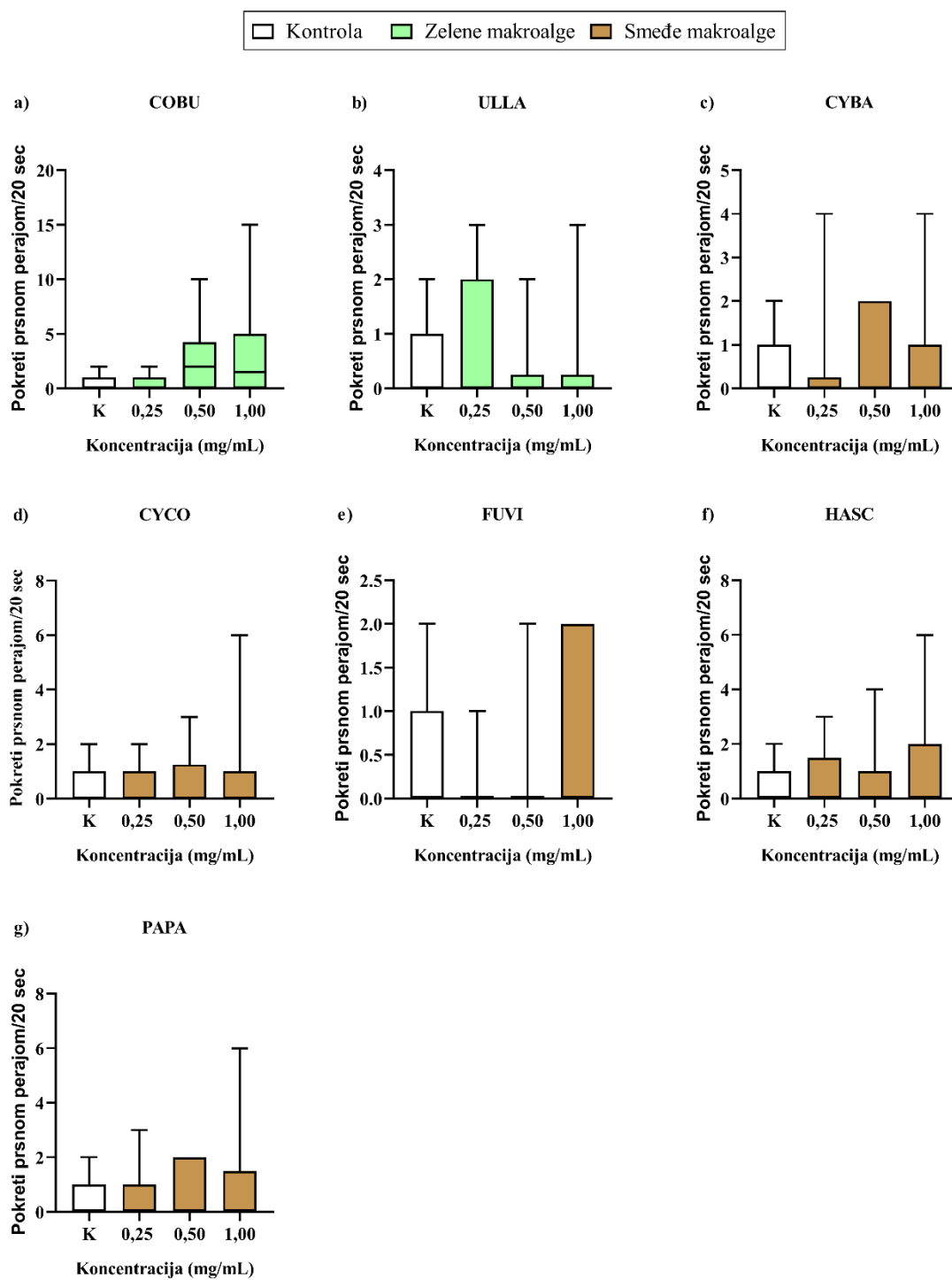
13) pri 1.00 mg/mL frakcije COBU, navedena koncentracija bit će izuzeta od daljnjeg testiranja antioksidativnog potencijala.



**Slika 14.** Prikaz otkucaja srca *Danio rerio* 96. sat nakon oplodnje u ovisnosti o testiranim polisaharidnim frakcijama: a) *Codium bursa* (COBU), b) *Ulva lactuca* (ULLA), c) *Cystoseira barbata* (CYBA), d) *Cystoseira compressa* (CYCO), e) *Fucus virsoides* (FUVI), f) *Halopteris scoparia* (HASC), g) *Padina pavonica* (PAPA). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu grupu označena je zvjezdicom (\*\*p < 0.01).

#### 5.4. Neurotoksični potencijal polisaharidnih frakcija makroalgi

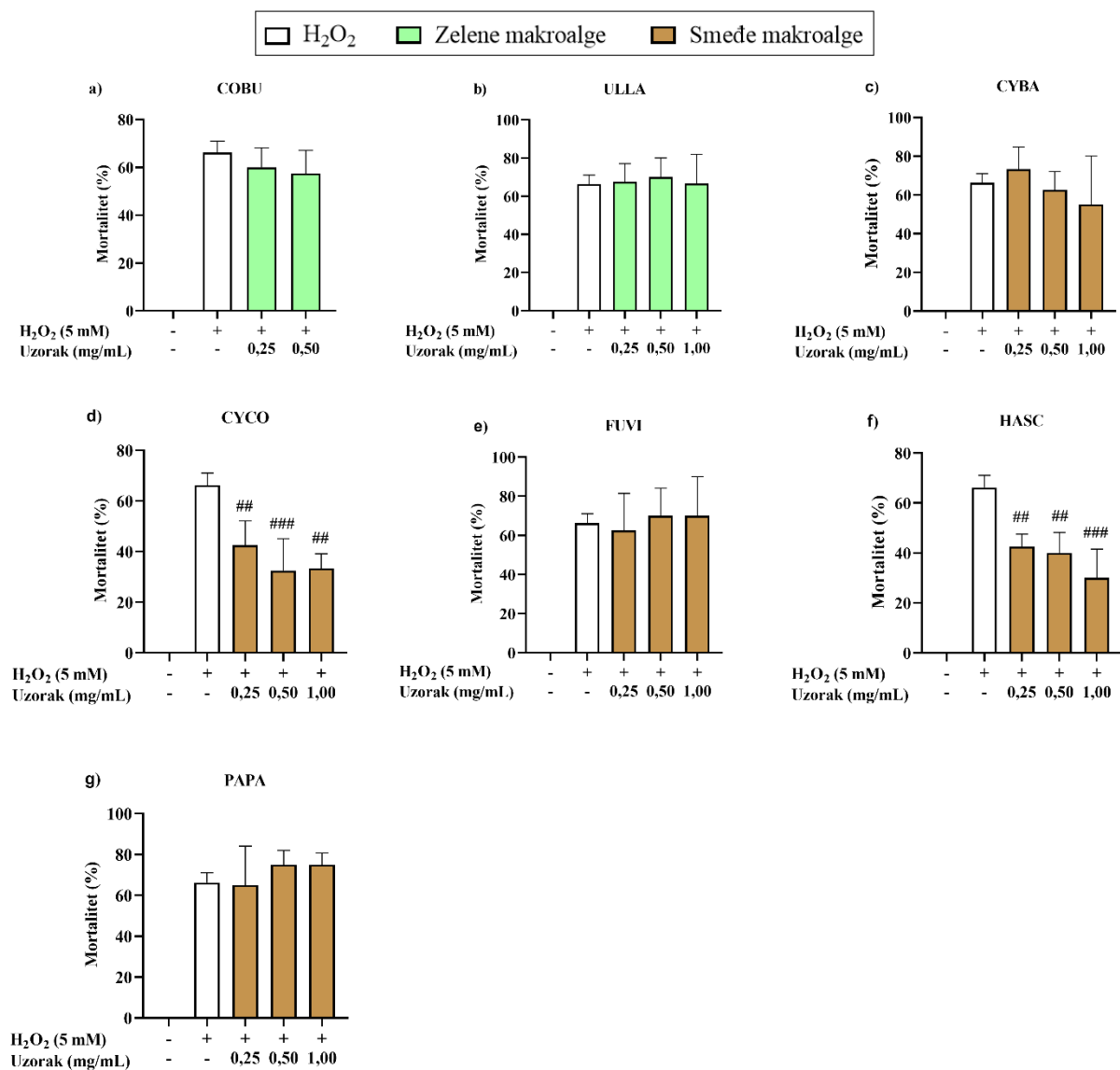
Nakon 96 sati izlaganja embrija *Danio rerio* testiranim polisaharidnim frakcijama, kod 10 nasumično odabranih jedinki izbrojan je broj pokreta prsnim perajama unutar perioda od 20 sekundi. Tijekom testiranja, nije primijećeno statistički značajno smanjenje niti povećanje ( $p>0.05$ ) u broju pokreta prsnim perajama ličinaka zebrića pri niti jednoj koncentraciji polisaharidnih frakcija (Slika 15). Kod ličinaka izloženim 1.00 mg/mL frakcije *Codium bursa* može se uočiti porast u broju pokreta prsnim perajama ( $3.10\pm 4.58$  pokreta perajom/20 sec) u odnosu na kontrolnu skupinu ( $0.47\pm 0.74$  pokreta perajom/20 sec), iako ne statistički značajan ( $p=0.087$ ).



**Slika 15.** Prikaz pokreta prsnih peraja ličinka *Danio rerio* 96 sati nakon oplodnje u ovisnosti o promatranim polisaharidnim frakcijama: a) *Codium bursa* (COBU), b) *Ulva lactuca* (ULLA), c) *Cystoseira barbata* (CYBA), d) *Cystoseira compressa* (CYCO), e) *Fucus virsoides* (FUVI), f) *Halopteris scoparia* (HASC), g) *Padina pavonica* (PAPA).

### 5.5. Zaštitni utjecaj polisaharidnih frakcija makroalgi na stopu preživljavanja ličinki izloženih vodikovom peroksidu

U svrhu ispitivanja zaštitnog utjecaja polisaharidnih frakcija makroalgi na stopu preživljavanja, embriji riba zebrica izloženi su polisaharidnim frakcijama u prisutnosti i odsutnosti 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Primijećen je značajan porast mortaliteta embrija tretiranih s 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (66.25±4.79%) u odnosu na kontrolnu grupu (0.00±0.00%). Predtretman s polisaharidnim frakcijama makroalgi *Cystoseira compressa* i *Halopteris scoparia* statistički značajno je smanjio stopu mortaliteta pri svim testiranim koncentracijama (0.25-1.00 mg/mL). Predtretman polisaharidnom frakcijom *Cystoseira compressa* smanjio je mortalitet za 23.75% pri koncentraciji 0.25 mg/mL (p=0.0086), 33.75% pri koncentraciji 0.50 mg/mL (p=0.0007) i za 32.92% pri koncentraciji 1.00 mg/mL (p=0.0015), u odnosu na jedinke tretirane isključivo 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Predtretman polisaharidnom frakcijom *Halopteris scoparia* uzrokovao je sličan učinak, s izraženijim smanjenjem stope mortaliteta prilikom predtretmana s 1 mg/mL (36.25%, p<0.0001) u odnosu na vrijednosti dobivene unutar pozitivne kontrolne grupe (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Iako nisu statistički značajni (p>0.05), rezultati ukazuju kako je do blagog smanjenja stope mortaliteta došlo i prilikom izlaganja 1 mg/mL *Cystoseira barbata* (smanjenje od 11.25% u odnosu na pozitivnu kontrolu), 0.5 mg/mL *Cystoseira barbata* (6.25%), 0.5 mg/mL *Codium bursa* (8.75%).

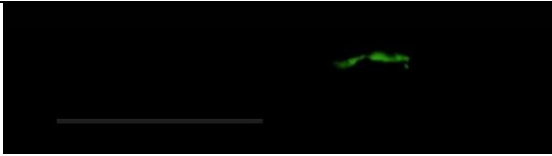
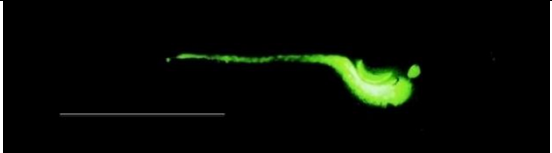
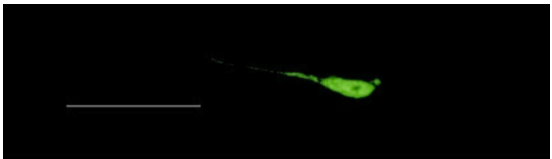
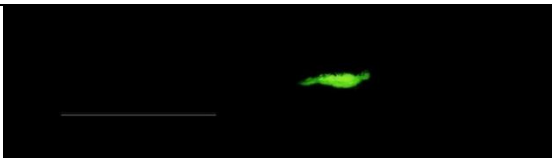
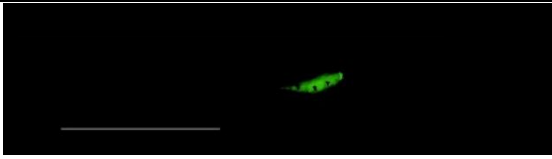

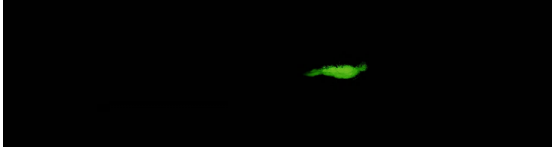



**Slika 16.** Prikaz zaštitnog utjecaja promatranih frakcija na stopu mortaliteta ribe zebriće *Danio rerio* izazvanu vodikovim peroksidom. Statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu grupu ( $H_2O_2$ ) označena je # ( $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

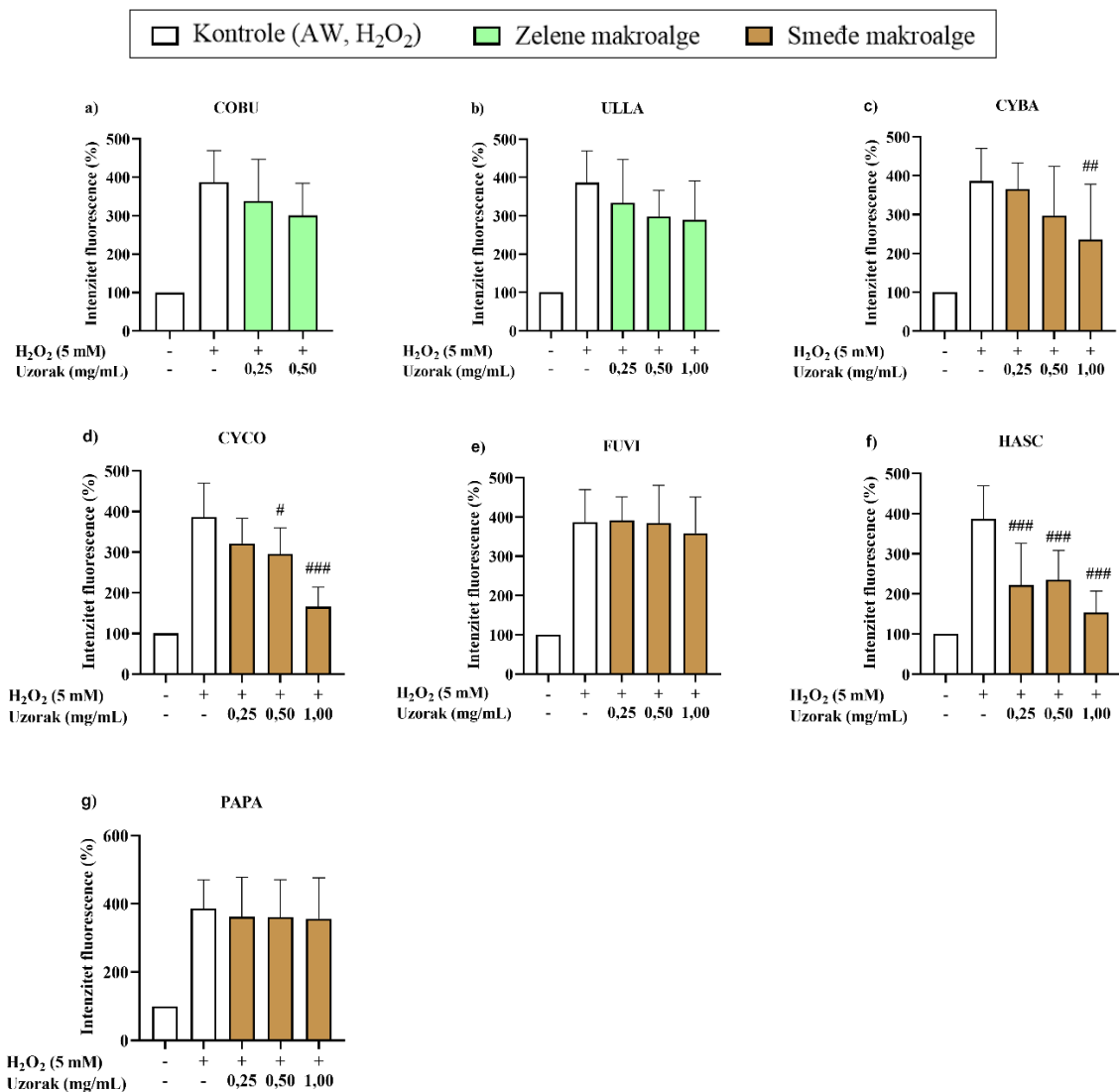


## 5.6. Zaštitni utjecaj polisaharidnih frakcija makroalgi na nastanak oksidativnog stresa kod ličinki izloženih vodikovom peroksidu

Nakon 96 hpf izlaganja embrija *Danio rerio* polisaharidnim frakcijama makroalgi, upotrebom fluorescentnog mikroskopa vizualizirana je produkcija i lokalizacija ROS-ova u živim jedinkama ličinke *Danio rerio* (Slika 17). Intenzitet fluorescence na snimljenim fotografijama određen je upotrebom ImageJ programa (Slika 18). Frakcije smeđih makroalgi *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa* i *Halopteris scoparia* pokazale su zaštitni utjecaj na nastanak oksidativnog stresa induciranog vodikovim peroksidom (Slike 17 i 18). Frakcija *Cystoseira barbata* pri koncentraciji 1.00 mg/mL smanjila je intenzitet fluorescence za 38.97% u odnosu na pozitivnu kontrolu ( $p=0.0232$ ). Frakcija *Cystoseira compressa* pri koncentraciji 0.50 mg/mL smanjila je intenzitet fluorescence za 23.58%, dok je pri koncentraciji 1.00 mg/mL došlo je do smanjenja intenziteta fluorescence za 57.10% ( $p<0.0001$ ) u odnosu na pozitivnu kontrolnu grupu na  $H_2O_2$ . Frakcija *Halopteris scoparis* značajno je smanjila intenzitet fluorescence pri svim koncentracijama u odnosu na pozitivnu kontrolu (0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL i 1.00 mg/mL) (Slika 17, e). Pri koncentraciji 0.25 mg/mL intenzitet fluorescence smanjio se za 42.51%, a pri koncentraciji 1.00 mg/mL za čak 60.28% ( $p<0.0001$ ). Frakcije zelenih makroalgi, *Codium bursa* i *Ulva lactuca* te frakcije smeđih algi *Fucus virsoides* i *Padina pavonica* nisu pokazale statistički značajno smanjenje intenziteta fluorescence u usporedbi s ličinkama izloženih vodikovom peroksidu, iako je u slučaju frakcija *Codium bursa* (0,5 mg/mL), *Ulva lactuca* (0,50 mg/mL, 1,00 mg/mL), *Cystoseira barbata* (0,50 mg/mL) zabilježen blagi pad fluorescence.

Tretman	Koncentracija (mg/mL)	
a) Umjetna voda (negativna kontrola)	0,00	
b) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (pozitivna kontrola)	0,00	
c) CYBA	1,00	
d) CYCO	0,50	
	1,00	
e) HASC	0,25	
	0,50	
	1,00	

**Slika 17.** Prikaz fluorescencije u živim ličinkama *Danio rerio*: a) umjetna voda (negativna kontrola), b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pozitivna kontrola), c) frakcija *Cystoseira barbata* (1.00 mg/mL), d) frakcija *Cystoseira compressa* (0.50 mg/mL i 1.00 mg/mL), e) frakcija *Halopteris scoparia* (0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 1.00 mg/mL). Skala = 100 μm.



**Slika 18.** Prikaz zaštitnog utjecaja promatranih frakcija na pojavu oksidativnog stresa uzrokovanog vodikovim peroksidom. Statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu grupu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) označena je # (#p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001). Rezultati su normirani na negativnu kontrolu (100%) te prikazani kao intenzitet fluorescence (%).

## 6. RASPRAVA

Morske makroalge važan su izvor sekundarnih metabolita koji pridonose različitim biološkim aktivnostima. Sadrže bioaktivne tvari poput polifenola, tokoferola, vitamin C te pigmente (karotenoidi, klorofili i fikobilini) koji posjeduju antifungalna, antivirusna, antibakterijska, antioksidativna, antitumorska i protuupalna svojstva (Michalak i Chojnacka, 2014). Polisaharidi predstavljaju jedne od glavnih sastavnica morskih algi. Dokazano je njihovo pozitivno bioaktivno djelovanje te ne-toksičnost, što je od velikog značaja za farmakologiju (Ananthi i sur., 2010). Za razliku od ostalih metabolita, karakterizira ih velika dostupnost i raznolikost kemijske strukture (Fernando i sur., 2017). Međutim, izrazitu pozornost među ostalim vrstama polisaharida pokazuju sulfatirani polisaharidi upravo zbog svojih brojnih aktivnosti. Djeluju protuupalno (Ananthi i sur., 2019; Jayawardena i sur., 2019), antikoagulantno (Athukorala i sur., 2007), antiproliferativno (Athukorala i sur., 2006) te antioksidativno (Athukorala i sur., 2006).

U ovom radu proveden je *in vivo* toksikološki test na embrijima zebrica *Danio rerio*. Ulazak kemijskih spojeva u embrij odvija se procesom pasivne difuzije. Zbog permeabilnosti koriona taj proces je posebno omogućen u najranijim stadijima razvoja zebrice (Garcia-Käufer i sur. 2015), zbog čega smo s izlaganjem embrija testiranim polisaharidnim frakcijama započeli unutar sat vremena od mrijesta. Test embriotoksičnosti nakon izlaganja embrija polisaharidnim frakcijama smeđih i zelenih algi nije pokazao toksičnost niti u jednoj ispitanoj koncentraciji, osim kod frakcije *Codium bursa* pri najvećoj koncentraciji (1,00 mg/mL). U svrhu davanja odgovora o povećanoj učestalosti smrtnosti i razvojnih abnormalnosti, frakcija *Codium bursa* će biti detaljnije kemijski okarakterizirana u nastavku istraživanja projekta "Bioprospecting Jadranskog mora" Instituta Ruđer Bošković. Kako je glavni cilj ovog istraživanja bio uz ispitivanje antioksidativnog potencijala polisaharidnih uzorka, ispitati i njihovu sigurnost za čovjeka i mogućnost implementacije u industriju, frakcija *Codium bursa* u koncentraciji od 1 mg/mL izuzeta je od daljnjeg ispitivanja.

Najveći udio sulfatnih grupa pronađen je u frakcijama smeđih algi *Cystoseira compressa* (95,17%), *Fucus virsoides* (71,86%), *Halopteris scoparia* (70,47%) i *Padina pavonica* (73,93%). Prema dobivenim rezultatima vidljivo je kako su frakcije *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa* i *Halopteris scoparia* pokazale najveći antioksidativni potencijal. To možemo povezati s visokim udjelom sulfatnih grupa koje su doprinijele većoj antioksidativnoj aktivnosti u usporedbi s ostalim testiranim frakcijama.

Fukoidan je jedan od sulfatiranih polisaharida prisutan u velikom broju smeđih makroalgi. Kao glavnu komponentu sadrži fukoze na koju su esterskim vezama vezane sulfatne grupe (Jayawardena i sur., 2020). Jedinstven je zbog visokog sadržaja L-fukoze i sulfatnih grupa (Li i sur., 2008). Udio sulfatnih grupa razlikuje se ovisno o vrsti alge. Bioaktivna svojstva fukoidana povećavaju se supstitucijom sulfatnih skupina (Jayawardena i sur., 2020). Vrste glikozidnih veza, udio i položaj sulfatnih grupa mogu se značajno razlikovati unutar sulfatiranih polisaharida, a ovisno o vrsti, regiji talusa, uvjetima uzgoja, postupcima ekstrakcije te analitičkim metodama (Jesus Raposo i sur., 2015). Biološke i farmakološke aktivnosti sulfatiranih polisaharida su obično rezultat složene interakcije nekoliko strukturnih značajki. To su stupanj sulfatacije, raspodjela sulfatnih skupina duž polisaharidne okosnice, molekulska masa, sastav ostataka šećera i stereokemija (Ghosh i sur., 2009). Dokazano je kako se antivirusno djelovanje sulfatiranih polisaharida povećava s molekularnom masom (Witvrouw i Clercq, 1997). Primijećeno je kako fukoidan iz smeđih algi pokazuje veće antioksidativno djelovanje od drugih sulfatiranih polisaharida (Jesus Raposo i sur., 2015). To je povezano sa sposobnošću polisaharida da se ugradi u stanicu i donira protone (Jesus Raposo i sur., 2015). Posljedično, sulfatirani polisaharidi imaju sposobnost sprječavanja nakupljanja i djelovanja ROS-ova (Jesus Raposo i sur., 2015). Proteinski dio polisaharida također može biti od velikog značaja, što se otičuje kroz činjenicu da denaturirani polisaharidi pokazuju značajno manji antioksidativni potencijal (Jesus Raposo i sur., 2015). Studija iz 2008. pokazala je kako antioksidativno djelovanje nije povezano samo s molekularnom masom i udjelom sulfatnih grupa, već ovisi i o sadržaju glukuronske kiseline i fruktoze (Zhao i sur., 2008). Neki autori navode kako je osim samog udjela sulfata, bitan omjer sulfata i fukoze za antioksidativnu aktivnost (Wang i sur., 2010). Sulfatna skupina pridonosi antioksidativnoj sposobnosti polisaharida da doniraju vodik te tako aktiviraju atom vodika anomernog ugljika (Wang i sur., 2010). Reaktivne vrste kisika kao što su vodikov peroksid, superoksidni anion i hidroksil radikali mogu nanijeti veliku štetu staničnim strukturama i tkivima, što može dovesti do različitih komplikacija (Xu i sur., 2017). Upravo se iz tog razloga vodikov peroksid sve češće koristi kao "sredstvo" za poticanje oksidativnog stresa u zebricama *in vivo* (Wang et al. 2020). Smanjenje stvaranja ROS-ova u ovisnosti o prisutnosti bioaktivnih spojeva pruža nam iznimno vrijedne odgovore o antioksidativnom potencijalu, u ovom slučaju, polisaharidnih frakcija. Wang i suradnici (2020) pokazali su zaštitni učinak sulfatirane polisaharidne frakcije smeđe makroalge *Hizikia fusiforme* na pojavu oksidativnog stresa u ličinkama zebriće uzrokovanog vodikovim peroksidom. Frakcija u koncentraciji od 50 µg/mL uzrokovala je 45.15%-tno smanjenje razine oksidativnog stresa u ličinkama zebriće, u odnosu na vrijednost dobivenu unutar negativne

kontrolne grupe. Kemijska analiza frakcije *H. fusiforme* ukazala je na udio sulfatnih grupa od 27,22%, od čega je fukoidan bio zastupljen čak 99,01%. Navedeni rezultat istaknuo je izrazitu antioksidativnu aktivnost fukoidana.

Kolorimetrijska metoda koja se unutar ovog istraživanja koristila za analizu sadržaja L-fukoze temelji se na reakciji između fukoze i smjese L-cisteina i sumporne kiseline. Mjerila se absorbancija na dvije valne duljine, 396 nm i 427 nm jer promjena absorbancije razlikuje prisutnost sadržaja fukoze od ostalih heksoza. Absorbancija ostalih heksoza ostaje ista pri obje valne duljine (Dobrinčić i sur., 2021). Prema normi IUPAC-ove nomenklature i terminologije, sulfatirani polisaharidi koji sadrže 20-60% L-fukoze mogu se klasificirati kao fukoidan (Dobrinčić i sur., 2021). U ovom istraživanju, najveći udio fukoze ima frakcija smeđe alge *Padina pavonica* (20.51%). Najmanji udio fukoze ima frakcija smeđe alge *Halopteris scoparia* (5.41%). Ostale frakcije ispitivanih smeđih i zelenih makroalgi sadrže udio fukoze u rasponu od 6.35-8.22%. Postoje mnogi vanjski i unutarnji čimbenici koji mogu utjecati na sadržaj fukoze u smeđim morskim algama kao što su vrsta i starost alge, sezona uzorkovanja, tip i uvjeti ekstrakcije, kao i kemijska struktura biomolekula (Dobrinčić i sur., 2021). Neke studije su pokazale kako se udio fukoze smanjuje tijekom duljeg vremena ekstrakcije i pri višim temperaturama, a razlog tome je što dolazi do degradacije lanca fukoze (Ale i sur., 2011). Prema navedenom, potrebno je naglasiti kako prilikom testiranja polisaharidne frakcije *Padina pavonica*, unatoč visokom udjelu sulfatnih grupa (72.93%) i fukoze (20.51%), nije zabilježena antioksidativna aktivnost pri testiranim koncentracijama. Prethodno navedeni razlozi svakako su mogli doprinijeti smanjenoj bioaktivnosti, kako polisaharida tako i ostalih bioaktivnih molekula u makroalgama.

Uronske kiseline nalaze se u fukoidanu u različitim koncentracijama, a to ovisi o raznim čimbenicima poput vrste i parametara ekstrakcije (Dobrinčić i sur., 2021). Studije pokazuju kako se povećani antioksidativni kapacitet može objasniti većim udjelom uronske kiseline. Makromolekule koje su bogate uronskom kiselinom osjetljive su na reakcije s radikalima te su učinkoviti hvatači istih (Vojvodić i sur., 2020). Uronska kiselina može reagirati s atomima vodika na anomernim atomima ugljika. U kiselim uvjetima hidroksilne skupe (OH) se deprotoniraju, što polisaharidima s uronskom kiselinom daje snažno antioksidativno djelovanje (Liu i sur., 2020). Najveći udio uronske kiseline utvrđeno je u frakciji smeđe alge *Cystoseira compressa* (8.45%). Visoki udio uronske kiseline zabilježen je i u frakciji *Cystoseira barbata* (7,13%), što je u skladu s bioaktivnošću ispitanjoj unutar ovog istraživanja. Prema našim saznanjima trenutno nema radova koji su ispitali antioksidativnu aktivnost uronske kiseline morskih makroalgi na embrijima/ličinkama zebrice *in vivo*. Većina dostupnih radova bazirana

je na ispitivanju kompleksne polisaharidne smjese, gdje je nemoguće razlučiti pozitivan učinak pojedinačnih biomolekula. Rajasekar i suradnici (2019) istraživali su polisaharidnu frakciju mikroalge *Spirulina platensis*. Udio sulfatnih grupa u grupi bio je 21.3%, s udjelom uronske kiseline od 7,9%. Provedbom DPPH testa (redukcija 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikala) utvrđen je izrazit antioksidativni potencijal polisaharidne frakcije. Nadalje, utvrđen je pozitivan utjecaj na rast ribe zebrice i fekunditet. Iz svega navedenog, može se zaključiti kako sulfatirani polisaharidi predstavljaju izniman potencijal u potrazi za učinkovitim, netoksičnim tvarima s antioksidativnim djelovanjem. Mogu se koristiti kao bogati izvor prirodnih antioksidanasa s potencijalnom primjenom u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Daljnja istraživanja svakako bi trebala biti usmjerena prema frakcioniranju spojeva od interesa te ispitivanju njihovih pojedinačnih aktivnosti.

Unutar istraživanja ispitivane su i polisaharidne frakcije zelenih makroalgi *Codium bursa* i *Ulva lactuca*. Jedan od najčešće prisutnih sulfatiranih polisaharida u zelenim makroalgama je ulvan. Sastoji se od sulfatirane ramnoze, uronskih kiselina (glukuronska kiselina i iduronska kiselina) i ksiloze. Zelene alge roda *Ulva* sadrže još tri polisaharida, a to su celuloza, ksiloglukan i glukuronan te zajedno s ulvanom čine do 45% suhe biomase (Wijesekara i sur., 2011). Studija iz 2005. je dokazala kako ulvani niske molekularne mase imaju jaču antioksidativnu aktivnost od ulvana veće molekularne mase. Razlog tome je što se sulfatirani polisaharidi s nižom molekularnom masom mogu učinkovitije uklopiti u stanice i tako donirati proton slobodnim radikalima (Qi i sur., 2005). Udio sulfata u frakciji *Ulva lactuca* je 33.55%, što je vrlo slično udjelu sulfata iz studije koja je provedena 2011. godine, a iznosi 26.90% (Wijesekara i sur., 2011). U ovom istraživanju frakcije zelenih algi *Codium bursa* i *Ulva lactuca* nisu pokazale značajno antioksidativno djelovanje u ličinkama zebrice. Mogući razlog tome je nizak udio sulfatnih grupa (26.97% i 33.55%) i vrlo nizak udio uronske kiseline (0.81% i 2.03%). No, još jedan mogući razlog je preniska ispitivana koncentracija.

Prilikom odabira koncentracija koje će biti testirane unutar ovog istraživanja vodili smo se idejom da utvrdimo što višu antioksidativnu aktivnost frakcija u što manjoj koncentraciji (maksimalno 1,00 mg/mL). Navedeni pristup omogućio bi lakšu implementaciju u industrijski sektor, istovremeno smanjujući trošak proizvodnih procesa te pojednostavljajući konzumaciju od strane potrošača (dnevna doza bi bila dosegnuta konzumiranjem velikog broja tableta ili praha). Nadalje, važno je naglasiti da uočeno antioksidativno djelovanje ispitanih polisaharidnih frakcija nije uzrokovano pojedinačnim spojem, već da je moguća interakcija između bioaktivnih komponenat, što može rezultirati sinergističkim i aditivnim učinkom.

Upravo iz tog razloga, ovo istraživanje poseban naglasak stavlja na potrebu provođenja bioloških metoda koristeći modelne organizme kao nadopunu kemijskim analizama.



## 7. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja antioksidativnog potencijala polisaharidnih frakcija dvije smeđe (*Codium bursa* i *Ulva lactuca*) i pet zelenih makroalgi (*Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Fucus virsoides*, *Halopteris scoparia* i *Padina pavonica*) Jadranskog mora može se zaključiti sljedeće:

1. Udio sulfatnih grupa veći je u frakcijama smeđih makroalgi nego u frakcijama zelenih makroalgi. Najveći udio sulfatnih grupa sadrže frakcije *Cystoseira compressa*, *Fucus virsoides*, *Halopteris scoparia* i *Padina pavonica*. Nadalje, udio fukoze najveći je u frakciji smeđe alge *Padina pavonica* te iznosi 20.51%. Najmanji udio fukoze sadrži frakcija *Halopteris scoparia* (5.41%). Najveći udio uronske kiseline sadrži frakcija *Cystoseira compressa* (8.45%), a najmanji udio određen je u frakciji zelene makroalge *Codium bursa* (0.81%).
2. Provođenjem testa embriotoksičnosti na ribama zebričama (ZET) utvrđeno je kako ni jedna frakcija nije uzrokovala promjenu otkucaja srca (kardiotoksičnost) ili utjecala na pokrete prsnom perajom (neurotoksičnost). Jedino je frakcija zelene makroalge *Codium bursa* pri najvećoj ispitivanoj frakciji (1.00 mg/mL) pokazala statistički značajno smanjenje stope otkucaja srca u odnosu na kontrolnu grupu. Ostale ispitane frakcije nisu embriotoksične pri ispitanim koncentracijama.
3. Najviša antioksidativna aktivnost zabilježena je prilikom izlaganja embrija frakcijama smeđih makroalgi *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa* i *Halopteris scoparia*. Uočeno je smanjenje intenziteta fluorescencije u odnosu na pozitivnu kontrolu (vodikov peroksid).
4. Smeđe makroalge predstavljaju održiv i alternativan prirodni izvor prirodnih antioksidanasa.
5. Sulfatirani polisaharidi pokazali su se kao dobri kandidati u potrazi za učinkovitim, netoksičnim tvarima s potencijalnim antioksidativnim djelovanjem. Upravo zbog dokazane ne-toksičnosti i visoke antioksidativne aktivnosti predstavljaju izniman potencijal upotrebe u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.
6. Embrij ribe zebrice *Danio rerio* se upravo zbog jednostavnosti rukovanja, visoke osjetljivosti te visoke genetske sličnosti s čovjekom istaknuo kao izvrstan modelni organizam koji bi ubuduće trebalo implementirati u probir spojeva s povoljnim bioaktivnim svojstvom.

7. Ovim istraživanjem pokazalo se da su istraživane smeđe i zelene alge Jadranskog mora izvrstan izvor polisaharida kao bioaktivnih molekula, a pomoću modelnog organizma i primijenjenih metoda dokazana je visoka antioksidativna aktivnost. Navedenim su stvoreni izvrsni preduvjeti za razvijanje funkcionalnih proizvoda i dodataka prehrani na bazi algi, pojedinačno ili čak kombinirajući različite vrste.

## 8. ZAHVALE

U prvom redu zahvaljujem se svojim mentoricama, dr. sc. Sanji Babić i prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac što su me uvele u ovaj rad, 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.

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.

Hvala mag.ing. Ani Dobrinčić što mi je pomogla pri kemijskoj analizi i utrošila svoje slobodno vrijeme.

Veliko hvala i mojoj obitelji, dečku i prijateljima koji su bili velika podrška u svakom trenutku.

## 9. POPIS LITERATURE

Abd-Ellatef, G.E.F., Ahmed, O.M., Abdel-Reheim, E.S., Abde-Hamid, A.H.Z. (2017) Ulva lactuca polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. *Breast Cancer - Targets and Therapy* **9**, 67-83.

M.T. Ale, J.D. Mikkelsen, A.S. Meyer (2011) Designed optimization of a single-step extraction of fucose-containing sulfated polysaccharides from Sargassum sp. *J. Appl. Phycol.* **24**,715–723.

Ananthi, S.; Raghavendran, H.R.; Sunil, A.G.; Gayathri, V.; Ramakrishnan, G.; Vasanthi, H.R. (2010) In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from Turbinaria ornata (Marine Brown Alga). *Food Chem. Toxicol.* **48**, 187–192.

Anjali, K.P., Sangeethab, B.M., Devib, G., Raghunathanc, R., Duttaa, S. (2019) Bioprospecting of seaweeds (Ulva lactuca and Stoechospermum marginatum): The compound characterization and functional applications in medicine-a comparative study. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* **200**, 111622

Araújo, R., Vázquez Calderón, F., López, J.S., Costa Azevedo, I., Bruhn, A., Fluch, S., Garcia Tasende, M., Ghaderiardakani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., Mac Monagail, M., Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., Ullmann, J. (2021) Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science* **7**

Ashayerizadeh, O., Dastar, B., Pourashouri, P. (2020) Study of antioxidant and antibacterial activities of depolymerized fucoidans extracted from Sargassum tenerrimum. *Int. J. Biol. Macromol.* **151**,1259–1266.

Athukorala, Y.; Kim, K.N.; Jeon, Y.J. (2006) Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, Ecklonia cava. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1065–1074.

Athukorala, Y.; Lee, K.W.; Kim, S.K.; Jeon, Y.J. (2007) Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresour. Technol.* **98**, 1711–1716.

Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., ... Martins, R. N. (2012) Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, (69).

Babić, S., Barišić, J., Višić, H., Sauerborn Klobučar, R., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Čož- Rakovac, R., i Klobučar, G. (2017) Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Research* **115**, 9–21.

Babić, S., Čižmek L., Maršavelski, A., Malev, O., Pfeiger, M., Strunjak-Perović, I., Topić Popović, N., Čož-Rakovac, R. i Trebše, P. 2021. Utilization of the zebrafish model to unravel the harmful effects of biomass burning during Amazonian wildfires. *Scientific Reports* **11**, 2527.

Bambino, K., Chu, J. (2017) Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Developmental Biology* **124**, 331-359.

Berov, D., Deyanova, D., Georgieva, I., Gyosheva, B., Hiebaum, G. (2012) *Cystoseira* Sp. – Dominated Macroalgal Communities in the Sw Black Sea (Burgas Bay, Bulgaria). Current State And Possible Long-Term Effects Of Eutrophication. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* **65(6)**, 821-830.

Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., & Strecker, R. (2014) The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*, **22(21)**, 16247–16261.

Briegera, K., Schiavonea, S., Miller Jr., F.J., Krausea, K.H. (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly* **142**

Caruana, M., Camilleri, A., Farrugia, M.Y., Ghio, S., Jakubičková, M., Cauchi, R.J., Vasallo, N. (2021) Extract from the Marine Seaweed *Padina pavonica* Protects Mitochondrial Biomembranes from Damage by Amyloidogenic Peptides. *Molecules* **26**, 1444-1461.

CEVA (2019) Edible seaweed and microalgae - Regulatory status in France and Europe. *Société d'économie mixte locale*, France.

Choi, T.Y., Choi, T.I., Lee, Y.R., Choe, Kim, C.H. (2021) Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine* **53**, 310-317.

D Costa, A., Shepherd, I.T. (2009) Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish* **6(2)**, 169-177.

Dizdaroglu, M. i Jaruga, P. (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research* **46(4)**, 382–419.

Dobrinčić, A., Dobrosravić, E., Pedisić, S., Balbino, S., Elez Garofulić, I., Čož-Rakovac, L., Dragović-Uzelac, V. (2021) The effectiveness of the *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata* fucoidan isolation as a function of applied pre-treatment and extraction conditions. *Algal research* **56**.

Dominguez, H., Loret, E.P. (2019) *Ulva lactuca*, A Source of Troubles and Potential Riches. *Marine drugs* **17(6)**, 357-377.

Goswami G. (2015) Diverse applications of algae. *International Journal of Advanced Research in Science, Engineering and Technology* **4**, 1102-1109.

Fernando, I.P.S.; Sanjeeva, K.K.A.; Samarakoon, K.W.; Lee, W.W.; Kim, H.-S.; Kim, E.-A.; Gunasekara, U.K.D.S.S.; Abeytunga, D.T.U.; Nanayakkara, C.; De Silva, E.D.; et al. (2017) FTIR characterization and antioxidant activity of water soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. *Algae* **32**, 75–86.

Garcia-Käufer, M., Gartiser, S., Hafner, C., Schiwiy, S., Keiter, S., Gründemann C., Hollert, H. (2015) Genotoxic and teratogenic effect of freshwater sediment samples from the Rhine and Elbe River (Germany) in zebrafish embryo using a multi-endpoint testing strategy. *Environmental Science and Pollution Research International* **22 (21)**, 16341-16357.

Ghosh, T.; Chattopadhyay, K.; Marschall, M.; Karmakar, P.; Mandal, P.; Ray, B. (2009) Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*, **19**, 2–15.

Grbec, B., Matić, 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 and Applied Geophysics* **175**, 4031-4046.

Gregurić Gračner, G., Lončarić, N., Bubić Špoljar, J., Dovč, A., Fuš, K., D. Gračner, D. i Pavičić, Ž. (2019) 3R načelo u zaštiti dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe - jučer, danas, sutra. *Veterinarska stanica* **50(1)**, 63-73.

Grozdanić, N., Zdunić, G., Šavikin, K., Đuričić, I., Kosanić, M., Mačić, V., Matić, I.Z., Stanojković, T.P. (2019) Seasonal Variation In Biopharmaceutical Activity And Fatty Acid Content Of Endemic Fucus Virsoides Algae From Adriatic Sea. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* **76(5)**, 833-844.

Guschina, I.A., Harwood, J.L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* **45**, 160-186.

Güner, A., Nalbantsoy, A., Sukatar, A., & Karabay Yavaşoğlu, N. Ü. (2019) Apoptosis-inducing activities of Halopteris scoparia L. Sauvageau (Brown algae) on cancer cells and its biosafety and antioxidant properties. *Cytotechnology*. *Cytotechnology* **71(3)**, 687-704.

Hadj Ammar, H., Lajili, S., Ben Said, R., Le Cerf, D., Bouraoui, A., Majdoub, H. (2015) Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus Cystoseira. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **23(1)**.

Hentati, F., Delattre, C., Ursu, A.V., Desbrieres, J., Le Cerf, D., Gardarin, C., Abdelkafi, S., Michaud, P., Pierre G. (2018) Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed Cystoseira compressa. *Carbohydrate Polymers* **198**, 589-600.

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.

Holdt, S.L., Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food application and legislation. *Journal of Applied Phycology* **23**, 543-597.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Matthews, L. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, **496(7446)**, 498–503.

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., Castro-Puyana, M. (2012) Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. U: *Marine Bioactive Compounds* (Hayes M., ured.), Springer, Boston, MA, str.55-98.

Ibrahim, A.M. i Abdel-Tawab, H. (2020) *Cystoseira barbata* marine algae have a molluscicidal activity against *Biomphalaria alexandrina* snails supported by scanning electron microscopy, hematological and histopathological alterations, and larvicidal activity against the infective stages of *Schistosoma mansoni*. *Biologia* **75**, 1945-1954.

Jayawardena, T.U.; Fernando, I.P.S.; Lee, W.W.; Sanjeeva, K.K.A.; Kim, H.S.; Lee, D.S.; Jeon, Y.J. (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.

Jayawardena, T.U., Wang, L., Asanka Sanjeeva, K.K., In Kang, S., Lee, J.S., Jeon, Y.J. (2020) Antioxidant potential of sulfated polysaccharides from *Padina boryana*; protective effect against oxidative stress in *in vitro* and *in vivo* zebrafish model, *Marine drugs* **18**, 212-226.

Jerković, I., Kranjac, M., Marijanović, Z., Roje, M., & Jokić, S. (2019) Chemical Diversity of Headspace and Volatile Oil Composition of Two Brown Algae (*Taonia atomaria* and *Padina pavonica*) from the Adriatic Sea. *Molecules*, **24(3)**, 495.



Jesus Raposo, M.F., Morais, A.M.B., Morais, R.M.S.C. (2015) Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Marine drugs* **13**, 2967-3028.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. (2013) Application of novel extraction technologies for extraction of bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem* **61** (20), 4667-4675.

Kammoun, I., Salah, H.B., Saad, H.B, M Cherif, B., Droguet, M., Magné, C., Kallel, C., Boudawara, O., Hakim, A., Gharsallah, N., Amara, I.B. (2018) Hypolipidemic and cardioprotective effects of *Ulva lactuca* ethanolic extract in hypercholesterolemic mice. *Archives of Physiology and Biochemistry* **124:4**, 313-325.

Kim, S.-K., i Pangestuti, R. (2011) *Biological Activities and Potential Health Benefits of Fucoxanthin Derived from Marine Brown Algae*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 111–128.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995) Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental dynamics* **203**, 253-310.

Kossack, M. E., & Draper, B. W. (2019) Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). *Current Topics in Developmental Biology* **134**, 119-149.

Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T. (2015) Biological potential of marine macroalgae of the genus *Cystoseira*. *Acta Biologica Hungarica* **66(4)**, 374–384.

Kraan, S. (2012) Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook. *Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*.

Lahaye, M., Robic, A. (2007) Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules* **8(6)**, 1765-1774.

Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R. (2008) Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, **13**, 1671–1695.

Linardić, J. (1949) Studies on the Adriatic Fucus (*Fucus virsoides*). *Acta Botanica Croatica* **12-13(1)**, 7-131.

Liu, X., Zhang, X., Zhang, X., Li, F., & Zhao, H. (2020) Effects of different drying methods on the physicochemical and antioxidative characteristics of *Osmunda japonica* Thunb. polysaccharides. *Journal of Food Processing and Preservation*.

Lorenzo, J., Agregán, R., Munekata, P., Franco, D., Carballo, J., Şahin, S., ... Barba, F. (2017) Proximate Composition and Nutritional Value of Three Macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Marine Drugs* **15(11)**, 360.

Naselli-Flores, L. i Barone, R. (2009) Green algae. *Encyclopedia of Inland Waters* 166-173.  
Melton, L.D., Smith, B.G., Determination of the uronic acid content of plant cell walls using a colorimetric assay, *Handb. Food Anal. Chem.* **1-2**,735-738.

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*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **13 (1)**, 207-220.

Michalak, I., Chojnacka, K. (2014) Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences* **15**, 160–176.

Milović, S., Stanković, I., Nikolić, D., Radović, J., Kolundžić M., Nikolić, V., Stanojković, T., Petović, S., Kundaković-Vasović, T. (2019) Chemical Analysys od Selected Seaweeds and Seagrass from the Adriatic Coast of Montenegro. *Chemistry & biodiversity*.

Mohapatra L, Pati P, Panigrahy R, Bhattamisra SK. (2013) Therapeutic health booster: seaweeds against several maladies. *Indian Journal of Marine Sciences* **42**, 538-546.

Moroney, J. V., Ynalvez, R. A., (2009) Algal Photosynthesis. U: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, str. 1-7.

Najdek, M., Iveša, Lj., Paliaga, P., Blažina, M., Čelig, A. (2014) Changes in the fatty acid composition of *Fucus virsoides* J. Agardh in response to the type of substratum. *Acta Adriatica* **55(1)**, 19-30.

Nüsslein-Volhard, C. (2012) The zebrafish issue of Development. *Development* **139**, 4099-4103.

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

Osterc, A., & Stibilj, V. (2008) 127I and 129I/127I isotopic ratio in marine alga *Fucus virsoides* from the North Adriatic Sea. *Journal of Environmental Radioactivity*, **99(4)**, 757-765.

Padilla, S., Glaberman, S. (2020) The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. U: *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology* (Pope, C.N. i Liu, J., ured.) str. 525-532.

Pangestuti, R., Siahaan, E.A., Kim, S.K. (2018) Photoprotective Substances Derived from Marine Algae. *Marine drugs* **16**, 399-415.

Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D. A., Juliano, P. (2016) Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine drugs*, **14**, 1-34.

Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X., et al. (2005) Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, **37**, 195–199.

Rajasekar, P., Palanisamy, S., Anjali, R., Vinosha, M., Elakkiya, M., Marudhupandi, T., Tabarsa, M., You, S.G., Prabhu, N.M. (2019) Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. *International journal of biological macromolecules*, **141**, 809-821.

Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001.

Ribas, L., i Piferrer, F. (2013) The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture* **5**, 1-32.

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.

Sanjeeva, K. K. A., Kang, N., Ahn, G., Jee, Y., Kim, Y.-T., & Jeon, Y.-J. (2018) Bioactive potentials of sulfated polysaccharides isolated from brown seaweed *Sargassum* spp in related to human health applications: A review. *Food Hydrocolloids*, **81**, 200–208.

Sellimi, S., Maalej, H., Rekik, D. M., Benslima, A., Ksouda, G., Hamdi, M., ... Hajji, M. (2018) Antioxidant, antibacterial and in vivo wound healing properties of laminaran purified from *Cystoseira barbata* seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, **119**, 633–644.

Shafik, A.M., 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.

Sudhakar, K., Mamat, R., Samykano, M., Azmi, W. H., Ishak, W. F. W., & Yusaf, T. (2018) An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **91**, 165–179.

Sun, L.; Wang, C.; Shi, Q.; Ma, C. (2009) Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, 42–47.

Thiyagarasaiyar, K., Goh, B.-H., Jeon, Y.-J., & Yow, Y.-Y. (2020) Algae Metabolites in Cosmeceutical: An Overview of Current Applications and Challenges. *Marine Drugs* **18(6)**, 323-356.

Vojvodić, S., Luković, J. D., Zechmann, B., Jevtović, M., Pristov, J. B., Stanić, M., Lizzul, A.M., Pittman, J.K., Spasojević, I. (2020) The effects of ionizing radiation on the structure and antioxidative and metal-binding capacity of the cell wall of microalga *Chlorella sorokiniana*. *Chemosphere*, **260**, 127553.

Wang, S.H., Huang, C.Y., Chen, C.Y., Chang, C.C., Huang, C.Y., Dong, C.D., Chang, J.S. (2020) Structure and Biological Activity Analysis of Fucoidan Isolated from *Sargassum siliquosum*. *ACS omega* **5**, 32447–32455.

Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., Yao, Y. (2010) A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydr. Polym.* **80**,84–93.

Wang, W., Fang, S., Xiong, Z. (2019) Protective effect of polysaccharide from *Ligusticum chuanxiong* hort against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in zebrafish embryo. *Carbohydrate Polymers* **221**, 73-83.

Wijesinghe, W.A.J.P. i Joen, Y.J. (2011) Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive component from brown seaweeds: A review. *Phytochemistry Reviews* **10(3)**, 431-443.

Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S.-K. (2011) Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, **84(1)**, 14–21.

Witvrouw, M.; de Clercq, E. (1997) Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* **29**, 497–511.

Xu, S.-Y., Huang, X., & Cheong, K.-L. (2017) Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Marine Drugs*, **15(12)**, 388-404.

Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., Attia, H. (2011) Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*. **128**, 895-901.

Yalcin, H.C., Amindari, A., Butcher, J.T., Althani, A., Yacoub M. (2017) Heart Function and Hemodynamics Analysis for Zebrafish Embryos. *Developmental Dynamics* **246 (11)**, 868-880.

Yu-Qing, T., Mahmood, K., Shehzadi, R., Furqan Ashraf, M. (2016) *Ulva Lactuca* and Its Polysaccharides: Food and Biomedical Aspects. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. **6(1)**, 140-151.

Zhao, X.; Xue, C.H.; Li, B.F. (2008) Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* **20**, 431–436.

Zhong, Q., Wei, B., Wang, S., Ke, S., Chen, J., Zhang, H., Wang, H. (2019) The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived from Marine Organisms: An Overview. *Marine drugs* **17**, 674-708.

Zhu, X.-Y., Wu, S.-Q., Guo, S.-Y., Yang, H., Xia, B., Li, P., & Li, C.-Q. (2018) A Zebrafish Heart Failure Model for Assessing Therapeutic Agents. *Zebrafish*, **15(3)**, 243–253

## 10. SAŽETAK

Karolina Begić

Ispitivanje antioksidativnog potencijala polisaharidnih frakcija makroalgi Jadranskog mora upotrebom embrija zebrice *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Morske makroalge jedan su od najbogatijih izvora funkcionalnih metabolita u morima i oceanima. Jadransko more posebno je izazovno stanište upravo zbog visokog saliniteta, velikih temperaturnih oscilacija, relativno male dubine, a posljedično time i povećanog utjecaja UVA i UVB zračenja. Da bi preživjele u takvim uvjetima, makroalge su evolucijski razvile niz bioaktivnih spojeva koji reduciraju nastanak slobodnih radikala i spriječavaju nastanak oksidativnog stresa. U tom kontekstu, upravo su se polisaharidi istaknuli kao vrlo važna strukturno raznolika skupina spojeva. Unutar ovog rada istražen je antioksidativni potencijal polisaharidnih frakcija dvije zelene (*Ulva lactuca* i *Codium bursa*) i pet smeđih makroalgi (*Padina pavonica*, *Halopteris scoparia*, *Cystoseira compressa*, *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides*) Jadranskog mora unutar živog embrija zebrice *Danio rerio*. Oksidativni stres induciran je dodatkom vodikovog peroksida u tretman s polisaharidnim frakcijama. Najviša antioksidativna aktivnost zabilježena je na 1 mg/mL polisaharidnih frakcija *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa* i *Halopteris scoparia* (38,97, 57,10 i 60,28%-tno smanjenje razine oksidativnog stresa u odnosu na kontrolnu grupu na vodikovom peroksidu). Razlog tome je kemijski sastav polisaharidnih frakcija (visok udio sulfatnih grupa, fukoze i uronske kiseline). Standardiziranim testom embriotoksičnosti dokazana je ne-toksičnost i sigurnost za primjenu. Zaključno, dobiveni rezultati sugeriraju kako su upravo polisaharidi izolirani iz makroalgi Jadranskog mora neiscrpan izvor prirodnih antioksidansa s velikim potencijalom primjene u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Ključne riječi: polisaharidi, zelene i smeđe makroalge, antioksidativna aktivnost, test embriotoksičnosti, modelni organizam

## 11. SUMMARY

Karolina Begić

Evaluation of the antioxidant activity of polysaccharides isolated from the Adriatic Sea macroalgae using zebrafish *Danio rerio* embryos (Hamilton, 1822)

Marine macroalgae are one of the richest sources of functional metabolism in the seas and oceans. The Adriatic Sea is a particularly challenging habitat precisely because of its high salinity, large temperature oscillations, relatively shallow depth, consequent weather and increased impact of UVA and UVB radiation. To survive in such conditions, macroalgae have evolved a number of bioactive compounds that reduce the formation of free radicals and prevent the occurrence of oxidative stress. In this context, polysaccharides have emerged as a very important structurally diverse group of compounds. Within this work, the antioxidant potential of polysaccharide fractions of two green (*Ulva lactuca* and *Codium bursa*) and five brown macroalgae (*Padina pavonica*, *Halopteris scoparia*, *Cystoseira compressa*, *Cystoseira barbata* and *Fucus virsoides*) of the Adriatic Sea within the living zebra embryo *Danio rerio* was investigated. Oxidative stress was induced by the addition of hydrogen peroxide to the treatment with polysaccharide fractions. The highest antioxidant activity was recorded at 1 mg/mL of polysaccharide fractions of *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa* and *Halopteris scoparia* (38.97, 57.10 and 60.28% reduction in oxidative stress levels compared to the control group on hydrogen peroxide). The reason for this is the chemical composition of polysaccharide fractions (high proportion of sulfate groups, fucose and uronic acid). A standardized embryotoxicity test demonstrated non-toxicity and safety for use. In conclusion, the obtained results suggest that polysaccharides isolated from the macroalgae of the Adriatic Sea are an inexhaustible source of natural antioxidants with great potential for application in the food and cosmetics industry.

Key words: polysaccharides, green and brown macroalgae, antioxidant activity, embryotoxicity test, model organism