

Comet assay til kvantifisering av DNA-skade i marine bløtdyr (Mollusca) og fisk (Pisces)

En litteraturstudie

Charlotte Børresen

Lektorprogrammet (Realfag)

30 studiepoeng

Institutt for biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet



© Charlotte Børresen 2023

Title: Comet assay til kvantifisering av DNA-skade i marine bløtdyr (Mollusca) og fisk (Pisces)

Author: Charlotte Børresen

<https://www.duo.uio.no/#>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Det marine miljø er utsatt for mange miljøgifter som slippes ut fra industrien, via luftforurensing og dårlig avfallshåndtering i stort sett alle land. Comet assay er en anerkjent analysemetode som er mye brukt til å undersøke grad av miljøforurensning ved å måle DNA-skade i enkeltceller. Målet med litteraturstudien er å undersøke metodevariasjoner i studier som har brukt comet assay metoden til kvantifisering av DNA skade i marine organismer og hvordan dette kan påvirke resultatene fra metoden, der et utvalg av artikler fra de to taksonomiske gruppene Fisk (Pisces) og Bløtdyr (Mollusca) har blitt gjennomgått.

De parameterne som er undersøkt er prøvetakning, lagring av prøver, lysering, elektroforese og scoring. PubMed er brukt som søkemotor til å finne utvalget av forskningsartikler. Design og prøvetakningsresultatene, og scoring resultatene er delt opp i tre deler 1) de studiene som har studert hvor mye DNA-skade et eller flere spesifikke miljøgifter eller andre kilder til stress kan forårsake, 2) studiene som har eksponert organismer eller celler for sedimentekstrakt og 3) studiene som har undersøkt DNA-skade i forurensede områder. De cellene/vevene som har blitt undersøkt mest er gjeller og hemocytter/erytrocytter. Studiene bruker for det meste samme strøm (300 mA) og spenning (25 V). Elektroforesetiden i studiene i bløtdyr varierer fra 5 til 30 minutter og den alkaline utkveilingstiden varierer fra 5 til 45 minutter, i fisk varierer elektroforesetiden fra 15 til 30 min og den alkaline utkveilingstiden fra 15 til 80 minutter. Ingen av studiene har skrevet noe om hvor lang tid de har lagt prøvene på is/kjølig før støpning i agarose, men i noen studier er det oppgitt at prøvene har blitt lagt på is/kjølig umiddelbart etter prøvetakning. Lagring av prøver på is/kjølig kan ha en påvirkning på DNA-skade, dette burde derfor undersøkes nærmere ved senere studier.

Forskjeller i artssensitivitet mellom ulike rekker og mellom ulike celler og vev kan ha en påvirkning på resultatet for eksempel i sammenligning med hemocytter og gjeller der gjeller er mer sensitive for DNA-skade. Tiden i alkaline utkveiling varierer i stor grad og er en av parameterne som kan ha innvirkning på resultatene sammen med spenningsgradienten som svært få studier har regnet ut. Variasjonen av parametere som har blitt brukt i scoring gjør det vanskelig å sammenligne resultater på tvers av studier derfor kan det være lurt å oppgi flere parametere i studier gjort med comet assay. Det er noen studier som ikke har regnet med «hedgehogs» i sine resultater, dette kan føre til at resultatene viser mindre grad av DNA-skade enn det faktiske antallet. Alt i alt bør det stilles større krav til dokumentasjon av alle vurderingsparametere i comet assay, og det anbefales for fremtidige studier å undersøke

hvordan agarosekonsentrasjon, prøveopparbeiding og særlig vevsprosessering, samt både korttids- og langtids-lagring av prøver påvirker resultatene i comet assay.

Forord

Denne oppgaven er skrevet ved instituttet for biovitenskap (IBV) med hovedveileder professor Ketil Hylland og medveileder professor Anders Ruus. Oppgaven markerer slutten på lektorstudiet mitt.

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Ketil Hylland og Anders Ruus for en interessant oppgave, på tross av mislykkede feltturer og mangel på celler. Jeg er fortsatt veldig takknemlig for at jeg har fått gjort så mye laboratorie-, og feltarbeid. Jeg vil også takke for alle gode råd og veiledning underveis. Det at oppgaven ble endret til en litteraturstudie har ført til at jeg har fått et godt kunnskapsgrunnlag rundt faglitteraturen til comet assay, noe som har vært veldig spennende å lese om!

Tusen takk til Elise for alle gode samtaler og støtte, og for at du har vært en utrolig god venn som har hatt troen på meg da jeg ikke hadde det selv.

Tusen takk til Marte for muligheten til å ha noen å diskutere med når jeg har vært usikker, for korrekturlesning av oppgaven og alle andre hyggelige stunder både i løpet av masterskrivingen, men også gjennom hele lektorstudiet.

Tusen takk til Heidi for hjelp med hvordan jeg skulle gå fram med litteratursøkene.

Tusen takk til resten av vennene mine og familien min for all emosjonell støtte igjennom masterperioden, men også gjennom hele studiet.

Oslo, juni 2023, Charlotte Børresen

Forkortelser

AuNPs:	Gull-Nanopartikler
B[a]P:	Benzo(a)pyrene
CdCl ₂ :	Kadmiumklorid
Cu:	Kobber
CWA:	Chemical Warfare Agents
DNA:	Deoksyribonukleinsyre
EPC:	Epithelioma papulosum cyprinid
EndoIII:	Endonuclease-III
Fpg:	Formamidopyrimidine glycosylase
GEM:	Gemfibrozil
HgCl ₂ :	Sølvklorid
H ₂ O ₂ :	Hydrogen peroksid
HYP:	Hypoksia
HPLC:	High performance liquid chromatography
MMS:	Metylmetansulfonat
MNA:	Micronucleus Assay
n.k.:	Negativ kontroll
OTM:	Olive Tail moment
PAH:	Polysykliske aromatiske hydrocarboner
PCB:	Polykloreerte bifenyler
p.k.:	Positiv kontroll
SWCNTs:	Single-walled carbon nanotubes
TI:	%Tail DNA
TL:	Tail length
TM:	Tail moment

Zn:

Sink

Innhold

Sammendrag	iii
Forord	v
Forkortelser.....	vi
Introduksjonen	1
1.1 Comet assay som biomarkør	1
1.1.1 Design og prøvetaking.....	4
1.1.2 Lagring av prøver	4
1.1.3 Lysering og elektroforese	5
1.1.4 Scoring.....	5
1.2 Metodevariasjoner i comet assay.....	6
1.2.1 Enzymmodifisert comet assay	6
1.3 Mål for oppgaven	6
2 Materialer og metode.....	7
2.1 Datainnsamling.....	7
2.1.1 Kriterier for innsamling av data	7
2.1.2 Metode for innsamling av forskningsartikler	7
2.1.3 Databehandling.....	8
2.2 Kategorier.....	8
2.2.1 Design og prøvetakning.....	9
2.2.2 Lagring av prøver	9
2.2.3 Lysering og elektroforese	9
2.2.4 Scoring.....	9
3 Resultater	11
3.1 Bløtdyr.....	11
3.1.1 Design og prøvetakning.....	11
3.1.2 Lagring av prøver	16
3.1.3 Lysering og elektroforese	17
3.1.4 Scoring.....	18
3.2 Fisk	24
3.2.1 Design og prøvetakning.....	24
3.2.2 Lagring av prøver	28
3.2.3 Lysering og elektroforese	29
3.2.4 Scoring.....	30
4 Diskusjon	36

4.1 Design og prøvetakning.....	36
4.2 Lagring av prøver	37
4.3 Lysering og elektroforese	38
4.4. Scoring	38
4.5 Comet assay sammenlignet med andre metoder som brukes for å undersøke DNA-skade i celler	40
4.6 Usikkerheter knyttet til oppgaven	41
4.7 Fremtidige studier.....	41
5 Konklusjon.....	42
6 Litteraturliste	44
7 Appendiks.....	56
Vedlegg A. Elektroforeseforhold.	56
Vedlegg B. Lysisforhold.	58

Introduksjonen

1.1 Comet assay som biomarkør

Forurensning i det marine miljø har lenge vært et stort problem. Ulike miljøgifter slippes ut fra industrien, via luftforurensing og dårlig avfallshåndtering i stort sett alle land (Wilkinson et al., 2022). Dette har konsekvenser for de organismene som lever der siden miljøgiftene i utslippene kan påvirke helsetilstanden til organismene og i verste fall være dødelig for dem.

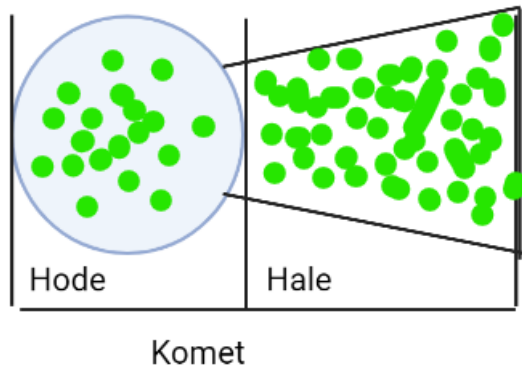
Biomarkører er mye brukt innenfor økotoxikologi til å overvåke miljøtilstanden i forurensede områder. Det er flere definisjoner av «biomarkør». Innenfor toksikologi kan en biomarkør defineres som «En cellulær eller variasjon i adferd som kan bli målt i vev eller kroppsvæske prøver eller på nivået til hele organismer som gir bevis for eksponering til og/eller effekter av en eller flere kjemiske miljøgifter (og/eller stråling)» (Depledge et al., 1995).

DNA-skade er en mye brukt biomarkør innenfor økotoxikologi. Den kan brukes til å studere både hele organismer og populasjoner utsatt for miljøgifter (Forbes et al., 2006). En av metodene som blir brukt til å kvantifisere DNA-skade i celler og vev er comet assay (Singh, 2016). Ostling and Johanson (1984) er de som opprinnelig utviklet metoden (cf. Collins 2004; Olive & Banath 2006; Afanasieva & Sivolob, 2018), basert på det tidligere arbeidet til Rydberg & Johansen (Rydberg & Johansen, 1978). De var de første til å direkte kvantifisere DNA-skade i individuelle celler ved først å lysere celler støpt i agarose under alkaliske forhold. Metoden har videre blitt modifisert av Singh og kolleger (Singh et al., 1988) som beskrev den moderne versjonen av comet assay som brukes i dag. Modifiseringen innebar å utføre elektroforesen under sterke basiske forhold ($\text{pH} > 13$). Det blir antatt at å bruke basiske forhold på elektroforese bufferen i comet assay i større grad detekterer enkelt (og dobbelt) DNA-trådbrudd imens når analysen foregår under nøytrale forhold detekterer den kun dobbelt DNA-trådbrudd (Afanasieva & Sivolob, 2018).

Metoden brukes til å visualisere og måle enkelt og dobbelt DNA-trådbrudd i individuelle celler i mikroskop (Olive, 2002). I tillegg til å måle DNA-trådbrudd kan metoden også undersøke såkalte «alkali-labile sites» i cellekjernen til alle eukaryote celler (Collins et al., 2023). «Alkali-labile sites» er enhver DNA-modifikasjon som omdannes til trådbrudd under alkaline forhold for eksempel apurinisk/apyrimidinisk (AP-sites) (Collins et al., 2023). Comet assay metoden fikk først navnet «comet» i 1990 av (Olive et al., 1990) for å beskrive formen som kan sees i mikroskop, der cellene ser ut som kometer (Moller, 2018). Denne biologiske analysen (biomarkøren) har fått vid anvendelse innenfor toksikologi. Metoden blir brukt

innenfor gentoksisk testing, menneskelig bioovervåkning og molekylær epidemiologi, økotoksikologi samt fundamental forskning innenfor DNA-skade og reparasjon (Collins, 2004). Hovedfordelen med comet assay er at den er enkel å bruke, mange prøver kan bli prosessert i et enkelt eksperiment og at en kan visualisere skaden på enkelt-cellenivå (Collins et al., 2023).

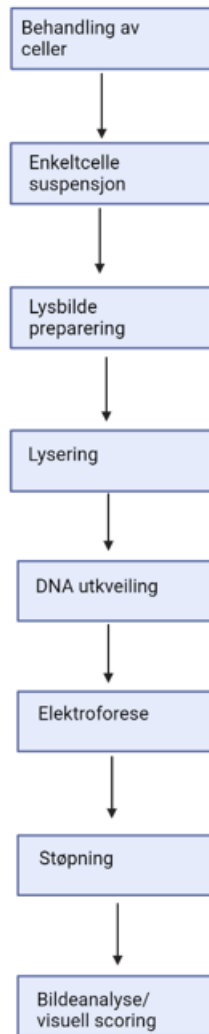
Skjematisk bilde av hvordan en komet ser ut er vist i **Figur 1**.



Figur 1: Skjematisk bilde av en komet. De grønne prikkene viser til fluorescensen.

Metoden fungerer på den måten at celler i suspensjon støpes i en agarosegel. Etter innstøpning blir cellene lagt i lysis buffer som fjerner lipider og proteiner. Deretter blir en markør som vises i fluorescensmikroskop tilsatt cellene, eksempler på mye brukte markører er SYBR Gold, SYBR Green og Etidiumbromid (Collins et al., 2023). Gelen blir videre eksponert for et svakt elektrisk felt slik at negativt ladet DNA kan vandre mot den positive anoden (Olive, 2002). Fluorescensmikroskop benyttes for å visualisere kometene.

Et skjematisk bilde av hvordan dette foregår er vist i **Figur 2**.



Figur 2: Skjematisk bilde av de ulike komponentene som comet assay består av.

Noen av utfordringene med comet assay er variabiliteten i metoden, dette gjelder både fra eksperiment til eksperiment, men også mellom ulike laboratorier som analyserer identiske prøver (Collins et al., 2014). En rekke forskningsgrupper har gått igjennom hva som kan gjøres for å gjøre variabiliteten i metoden så liten som mulig (Azqueta & Collins, 2013; Azqueta et al., 2011b; Brunborg et al., 2023; Collins, 2004; Collins et al., 2014; Collins et al., 2008; Ersson et al., 2013).

Ut ifra dette har fire kategorier som kan påvirke variasjoner i resultatene blitt undersøkt: 1) prøvetakning og utvalg, 2) lagring av prøver, 3) elektroforeseforhold og lysering, og 4) scoring.

1.1.1 Design og prøvetaking

Hvordan prøvetakingen foregår og designet av studien har mye å si for resultatene i comet assay. For å lage et godt design for en studie er det flere spørsmål som det er viktig å tenke over, slik som hva er det som skal undersøkes? Hva er målet med studien? Hvis det som skal undersøkes er hvordan et område eller en spesifikk art eller populasjon blir påvirket av en eller flere miljøgifter er det viktig å ha et godt utvalg av organismer. Det brukes ofte et fåtall av standard testorganismer fra ulike rekker fra et økosystem for å forutsi graden av skade fra miljøgifter (Spurgeon et al., 2020). Dette kan gi et feil bilde av faregraden til miljøgiftene, siden det er vist i en rekke studier at det er forskjeller i artssensitivitet på grunn av genetikk, livshistorie, fysiologi og diett (Nyman et al., 2014; Rubach et al., 2010). Organismer har ulike responser når de blir eksponert for miljøgifter, responsen kan være forskjellig innad i en populasjon, mellom populasjoner og også mellom arter. Responsen kan også variere mellom vev og det kan forekomme ulike typer DNA-skader (OECD, 2016). En standardisert protokoll for *in vivo* versjonen av comet assay i pattedyr finnes (OECD, 2016). *In vitro* versjonen av comet assay har ikke blitt implementert i offisielle regulatoriske retningslinjer og forskrifter (Frotschl, 2015). Det som skiller *in vitro* versjonen fra *in vivo* er kun noen få trinn der cellelinjer eller primære celler benyttes framfor vev fra intakte organismer (Žegura & Filipič, 2004). En mulig måte å kvantifisere lokal forurensning er å sammenligne nivåer av miljøgifter på innsiden og utsiden av område som er kontaminert (Berg et al., 2000), som kan brukes som et referanseområde. Et eksempel på dette er Indre Oslofjord som er et relativt forurenset område som ofte bruker referanser fra omliggende områder (NIVA, 2019).

1.1.2 Lagring av prøver

I løpet av livet til en celle blir DNA kontinuerlig skadet og reparert (Russev & Anachkova, 2009). For å unngå at disse lesjonene fører til mutasjonsdannelse og for bevare det genetiske materiale så har celler og organismer utviklet måter å reparere de ulike lesjonene (Russev & Anachkova, 2009). Ved lavere temperaturer vil kjemiske og biologiske reaksjoner i levende celler og andre mekanismer i kroppen gå saktere eller stoppe opp helt (Chang & Zhao, 2021). For at cellen ikke skal reparere DNA-skadene etter prøvetakning blir prøvene lagt på is eller kryopreservert. Det er imidlertid omdiskutert om kryopreservering påvirker DNA-skade. Resultatet fra noen studier er at det ikke er noen signifikant forskjell i ferske-, og fryste blodceller analysert med comet assay (Bankoglu et al., 2021; Hininger et al., 2004; Kwok et al., 2013; Ladeira et al., 2019). Andre studier har derimot vist at kryokonserverte celler har hatt betydelig større DNA-skade (Del Bo et al., 2015). Kryopresevering kommer ikke til å bli

undersøkt videre i denne oppgaven. Det som skal studeres videre er om artiklene oppgir hvor lenge og om prøvene har blitt lagret på is eller lagret kjølig før støpning i agarose.

1.1.3 Lysering og elektroforese

En av de faktorene som har mye å si for resultatene i comet assay er elektroforesen. Kritiske steg i analysen er agarose konsentrasjonen, lengden på alkalisk inkubasjon, og elektroforese betingelser (tid, temperatur og spenning) (Collins et al., 2014). Et av trinnene i protokollen til comet assay som ofte ikke er beskrevet godt nok er elektroforesen (Collins et al., 2008). Det er vanlig å utføre elektroforesen ved en fast spenning på rundt 25 V med 300 mA, for å oppnå dette justerer en ofte det totale volumet av elektroforese buffer (Collins et al., 2008). Det er spenningen på tvers av gelen som er drivkraften til elektroforesen av det ladede DNA-molekylet, dette blir målt i V/cm (Collins et al., 2008).

1.1.4 Scoring

Det er flere ulike parametere som kan brukes i comet assay for å måle DNA-trådbrudd i celler. Dette kan gjøres med et bildeanalysesystem eller ved visuell scoring. Et bildeanalysesystem vil si at det benyttes et program som gjør tellingen, mer eller mindre automatisk. Med ulike programvarer som kvantifiserer DNA-skaden. Visuell scoring går ut på at en manuelt teller opp kometene. Den vanligste skalaen går fra 0-4, der 0 vil si ingen DNA-skade og 4 er maksimal DNA-skade på en komet (Collins et al., 2008). Det er vanlig å score 100 kometer per gel (Moller et al., 2014). I et utvalg av 100 kometer vil den maksimale scoren være $4 \times 100 = 400$.

Noen av de vanligste parameterne som blir tatt i bruk er halelengde, «%Tail DNA» (TI) og halemoment (TM). Den mest vanlige parameteren å bruke er TI (OECD, 2016) som viser til hvor mye fluorescens det er i halen til kometen i relativt til hvor mye som er i hode. TI er uttrykt som % av total DNA-fluorescens i halen på kometene og brukes som et kvantitativt mål for skade (0-100%). TM regnes ut som produktet av halelengden og fraksjonen av totalt DNA i komethalen (Collins et al., 2023). TM er mye brukt siden den tar med i betraktningen både lengden og DNA-innholdet av komethalen (Collins et al., 2023). Det som kan være problematisk med TM er at den ikke bruker standard måleenheter (Collins et al., 2023), det er dermed vanskelig å visualisere nivået av skade som blir beskrevet. En annen parameter som blir tatt i bruk er halelengde (TL). Denne parameteren er kun nyttig å bruke når det er lave nivåer av DNA-skade siden den når maks lengde relativt tidlig og er dermed ikke anbefalt å bruke i bioovervåkningsstudier (Collins, 2014b).

Det at ulike studier bruker forskjellige parametere kan være problematisk i forbindelse med sammenligning på tvers av studier (Forchhammer et al., 2010). Derfor er det viktig å undersøke hvordan studier gjort med comet assay har scoret kometene sine og også hvilke resultater de har fått.

1.2 Metodevariasjoner i comet assay

Ved bruk av den vanlig comet assay er det kun enkelt- og dobbeltrådet trådbrudd og «alkalilabile sites» som vil bli kvantifisert (Muruzabal et al., 2021). Nyere modifikasjoner av metoden har også gjort det mulig å detektere dobbeltrådet DNA-trådbrudd, «cross-links» og base skade (Olive & Banáth, 2006).

1.2.1 Enzymmodifisert comet assay

Det har videre blitt utviklet en enzymmodifisert versjon av metoden som bruker lesjonsspesifikke enzymer fra DNA-reparasjonsmaskineriet til bakterier og mennesker for å kunne detektere flere typer DNA-skade enn den opprinnelige metoden (Muruzabal et al., 2021). De mest brukte enzymene er Formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) (Muruzabal et al., 2021; Møller et al., 2020) og Endonuclease-III (EndoIII) som i hovedsak brukes til å detektere oksiderte puriner og pyrimidiner (Muruzabal et al., 2021).

1.3 Mål for oppgaven

Målet med litteraturstudien er å beskrive metodevariasjoner i studier som har brukt comet assay til kvantifisering av DNA skade i utvalgte marine organismer, og hvordan dette kan påvirke resultatene fra metoden. De delene av metoden som er inkludert er design og prøvetakning, lagring av prøver, lysing og elektroforese og scoring. Dette er i stor grad en kvalitativ studie. Det å direkte sammenligne resultater fra ulike studier er utfordrende på grunn av store forskjeller i design. Det som varierer i designet av studiene er hvilke områder og/eller hvilke miljøgifter som undersøkes og andre parametere i designet på studiene slik som dose/konsentrasjonsintervall, lengden på eksponeringen og om eksponeringen foregår *in situ*, *in vivo* eller *in vitro*, og parametere brukt i scoring. Det som i større grad kan undersøkes kvantitativt er alkalinitet, utkveilingstid, spenning, strøm og elektroforesetid.

2 Materialer og metode

2.1 Datainnsamling

PubMed har blitt brukt som søkemotor. Den har et relevant utvalg av tidsskrifter og det er mange artikler som omfatter effekter i ulike organismer.

2.1.1 Kriterier for innsamling av data

Følgende kriteriene har blitt benyttet:

- Primærartikler
- Inkluderer kun data for marine organismer.
- Inkluderer kun bløtdyr (rekke Mollusca) og fisk (Pisces).

I de studiene som har bløtdyr og fisk, men som i tillegg har undersøkt flere rekker er resultatene tatt med. Disse artene er markert med rødt i teksten.

2.1.2 Metode for innsamling av forskningsartikler

Rammene jeg har satt for å finne utvalget av artikler er som følger:

- Artikler som har analysert celleprøvene sine med Comet Assay.
- Inkluderer ikke artikler som ikke har gjort egne analyser.

Søkeordene som har blitt for å finne utvalget av artikler til Bløtdyr er vist nedenfor:

```
«Comet Assay»[Mesh] AND ("Saline Waters"[Mesh] OR "Oceans and Seas"[Mesh]) AND "Mollusca"[Mesh] NOT (review[Publication Type]) AND ((fft[Filter]) AND (animal[Filter]) AND (english[Filter]))
```

Samme søkeord har blitt brukt for å finne artiklene som ser på bruken av Comet Assay i fisk utenom at Mollusca[Mesh] er byttet ut med Fishes[Mesh]:

```
((("Comet Assay"[MeSH Terms] AND ("Saline Waters"[MeSH Terms] OR "Oceans and Seas"[MeSH Terms]) AND "Fishes"[MeSH Terms]) NOT ("review"[Publication Type]) AND ((fft[Filter]) AND (animal[Filter]) AND (english[Filter])))
```


Grunnen til at «marine» ikke er brukt som søkeord er at det ikke er noen MeSH-term for dette i PubMed. Ved å søke med MeSH-termer kommer alle ordene som brukes om et begrep også opp i søket. For eksempel ved å bruke MeSH på comet assay vil også artikler som har brukt «single cell gel electrophoresis» istedenfor comet assay bli med i søkeresultatene.

Som nevnt ovenfor, ble metodene i hver studie delt inn i fire kategorier etter hva slags studier som har blitt gjennomført. Studiene har henholdsvis blitt inndelt i tre grupper 1) studier som har eksponert organismene for kjemikalier eller kilder til stress for å undersøke effekten på DNA skade, 2) de som undersøker hvordan sedimenter påvirker DNA skade i organismene gjennom eksponering for sedimentekstrakt og 3) de som undersøker DNA-skade i celler i forurensede områder der de som regel sammenligner med et referanseområde.

2.1.3 Databehandling

Microsoft Excel i Office 16 har blitt benyttet for å lagre rådataene. Rådataen fra Excel ble lastet opp i RStudio der den grafiske fremstillingen av dataene fra den alkaline utkveilingstiden og spenningen ble gjort med programmeringsspråket R (versjon 4.1.2) og pakken «tidyverse» (Wickham et al., 2019).

2.2 Kategorier

Fire komponenter av comet-analysen ble undersøkt:

- Design og prøvetakning
- Lagring av prøver
- Lysering og elektroforese
- Scoring

Organismer fra ulike rekker vil variere i fysiologi, diett og livshistorie. En litteraturgjennomgangsartikkel har undersøkt sensitivitet mellom ulike taksonomiske grupper som påvirkes av legemidler som ender opp i det marine miljø, der det er en tydelig forskjell (Urbina et al., 2019). Organismer i samme taksonomiske gruppe har en lignende grad av sensitivitet i forhold til organismer i andre taksonomiske grupper (Forbes & Calow, 2002). Derfor har informasjonen blitt organisert taksonomisk siden det er kjent at det er forskjeller mellom ulike organismegrupper.

Fisk er brukt mye til bioovervåking for å se på påvirkninger av miljøgifter i vann siden de er endemiske arter som gjør at de er gode å bruke for å se på ulike akvatiske regioner (Gajski et al., 2019a). Bløtdyr er mye brukt som bioindikatorarter for å overvåke forurensning i

kystvann blant annet *Mytilus* ssp. er mye brukt siden de er kommersielt viktige, er fastsittende, har medium-størrelse, de lager muslingsenger i grunt vann der de enkelt kan plukkes opp og har en stor utbredelse i tillegg til at de det hardføre arter som det er enkelt å holde i kultur (Beyer et al., 2017).

2.2.1 Design og prøvetakning

De parameterne det er blitt fokusert på i forbindelse med design og prøvetakning er:

- Hva som blir undersøkt i studiene (DNA-skade fra forurenset område, sedimentekstrakt, miljøgifteksponering osv.)
- Dose/konsentrasjonsintervall i de områdene som har eksponert organismer eller celler/vev for miljøgifter.
- Hvilke steder som har blitt studert det vil si hvilke estuarier, kystområder og eventuelt hvilke landegrenser disse områdene er plassert innenfor.
- Hvilke celletyper som har blitt undersøkt.
- Hva som har blitt undersøkt i studiene kjemikalier, forurensning i et/ flere områder. Om cellene har blitt eksponert *in vitro*, *in vivo* eller *in situ*.
- Positive-, og negative kontroller, og deres dose/konsentrasjonsintervall.
- Om og eventuelt hvilke referanseområder som har blitt undersøkt.

2.2.2 Lagring av prøver

Det som har blitt undersøkt er hvor lenge cellene/vevene er oppbevart på is/kjølig før de blir støpt i agarose.

2.2.3 Lysing og elektroforese

Parameterne i elektroforesen ble undersøkt strømstyrke, spenning og hvor lenge elektroforesen ble kjørt og tiden på alkalisk utkveiling. Andre parametere som ble studert er hvor lenge cellene har blitt oppbevart i lysis buffer og hvilken pH som ble brukt.

2.2.4 Scoring

Det er også ulikt hvilke parametere som har blitt undersøkt i forbindelse med scoring. Det veksles mellom å bruke TL, TM, OTM, «%Tail DNA» og visuell scoring med «arbitrary units». Det er flest som har brukt TI, de artiklene som har oppgitt TL og TM, er det mulig å regne om til TI, noe som dermed har blitt gjort. Se formel:

$$Tail\ moment = \frac{(\%Tail\ DNA \times TailLength)}{100}$$

I de studiene der resultatene ikke er oppgitt i tabell, men i graf, har denne blitt tolket. I de studiene som har oppgitt flere resultater fra ulike doseintervaller er kun den høyeste gjennomsnittlige DNA-skaden rapportert i denne oppgaven. De studiene som kun har oppgitt resultatene i median er markert.

3 Resultater

Det er sammenstilt en oversikt over informasjonen fra studiene gjort på gruppene bløtdyr og fisk der de fire kategoriene: design og prøvetakning, lagring av prøver, lysering og elektroforese og scoring er undersøkt. Alle resultatene fra bløtdyr med de fire kategoriene er presentert først, deretter presenteres resultatene for fisk. Design og prøvetakningsresultatene, og scoring resultatene er delt opp i tre deler 1) de studiene som har studert hvor mye DNA-skade et eller flere spesifikke miljøgifter eller andre kilder til stress kan forårsake, 2) studiene som har eksponert organismer eller celler for sedimentekstrakt og 3) studiene som har undersøkt DNA-skade i forurensede områder.

3.1 Bløtdyr

Søket ble utført og resultatene ble hentet ut 30. Mars 2023. Her kom det opp 33 søkeresultater for bløtdyr, alle studiene i søket fulgte de kriteriene som er satt.

3.1.1 Design og prøvetakning

Prøvetakningsresultatene er delt inn i to tabeller. Den første tabellen viser de studiene som har vurdert hvor mye DNA skade et eller flere spesifikke miljøgifter eller kilder til stress kan forårsake (**Tabell 1**). En studie har eksponert celler for sedimentekstrakt, dette er spesifisert i teksten. Studier som har studert DNA-skade i forurensede områder er vist i **Tabell 2**. De miljøgiftene som har blitt undersøkt mest er Benzo[a]pyren (B[a]P), Kobber (Cu) og Kadmium (Cd). De fleste studiene har undersøkt hemocytter og gjelleceller. Noen studier har undersøkt DNA-skade i flere arter.

De cellene/vevene som har blitt undersøkt i forbindelse med laboratorieforsøk er hemocytter, gjeller og sædceller (**Tabell 1**). Den arten som har blitt brukt mest som bioindikator for å se på DNA-skade i celler og vev er *M. edulis*, andre arter som har blitt undersøkt er *B. azoricus*, *M. galloprovincialis*, *N. chamaeleon* og *P. viridis*. Eksponeringstiden varierer fra 1 dag til 12 dager. Den vanligste eksponeringstiden er 3 dager/72 timer. De miljøgiftene eller kilder til stress som har blitt undersøkt er trykk og temperatur forskjeller, Metylmetansulfonat (MMS), B[a]P Styren, Cu, Sølvklorid (HgCl₂), Single-walled carbon nanotubes (SWCNT) i samhandling med Sink (Zn) og Cd, Kadmiumklorid (CdCl₂) og saltholdighet. Alle studiene har tatt med kontroller. En av studiene har undersøkt to ulike arter; *M. edulis* og *Arenicola marina*. *A. marina* ble eksponert *in vivo* til 18, 32, og 52 mg/L MMS i 24 -, og 72 timer, og sædceller ble eksponert *in vitro* til 52 mg/L MMS i 1 time og 24 timer (Lewis & Galloway, 2009). En annen studie som har sammenlignet to arter er Mamaca et al. (2005) som har

undersøkt artene *M. edulis* og *Symphodus melop.* Resultatene for sistnevnte finnes under seksjon 3.2 Fisk.

Tabell 1: Oversikt over hvilke/en områder, arter, celletype, kjemikalier/miljøgifter og dosering som har blitt undersøkt ved bruk av comet assay i laboratorieforsøk. Det er kun laveste og høyeste konsentrasjon er tatt med. n.k= negativ kontroll, p.k = positiv kontroll. *studien har brukt comet assay til å undersøke DNA-skade i flere arter.

Art:	Celletype:	Kjemikalie/str essor:	p.k./n.k,	Dose/kons. Intervall:	Eksponerings tid:	Referanse:
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Hemocytter	Trykk og temperatur variasjoner	CH ₄ , H ₂ S eller begge/NA	Temp: 7, 8.5 C. komprimert luft.	NA	(Dixon et al., 2004)
	Gjeller					
<i>Mytilus edulis</i>	Sædceller	B[a]P	NA/Ja	B[a]P 0.01- 1.0 µg/L	72 t	(Lewis & Galloway, 2009)*
	Hemocytter					
	Hemocytter	Styren	NA/Ja	2mg/L	7 d	(Mamaca et al., 2005)*
	Hemocytter	Cu	NA/Ja	(0- 100) µg/L	5 d	(Al-Subiai et al., 2011)
	Hemocytter	SWCNT+Cd, SWCNT+Zn, SWCNT+Cd+Z n	Cd/Ja	(5-500) µg/L av SWCNT	72 t	(Al-Shaeri et al., 2013)
	Gjeller					
	Hemocytter	HgCl ₂	NA/Ja	20 µg/L	3 d	(Tran et al., 2007)
	Hemocytter	Saltholdighet	40 µMol CdCl ₂ / 100% sjøvann kontroll	(25- 100)%	72 t	(Singh & Hartl, 2012)
	Gjeller					
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hemocytter	Mikroplast i lo, Cu	(18, 32, 56) µg/L a v Cu / Ja	(56- 180) µg/L av lo.	7 d	(Alnajar et al., 2021)
<i>Nerita chamaeleon</i>	Gjeller	CdCl ₂	H ₂ O ₂ ; 1- 50 µM, (30 min)/NA	(10-75 µg/L)	5 d	(Sarkar et al., 2015)
<i>Perna viridis</i>	Hemocytter	B[a]P	NA/Ja	(0.3 -30) µg/L	0 (bare ubehandlet gruppe), 1, 3, 6 og 12 d	(Siu et al., 2004)

En studie har undersøkt hvordan eksponering til sedimentekstrakt fra Cork havn, der organismene har blitt hentet fra klekkerier på vestkysten av Irland, kan påvirke DNA-skade i cellene (Hartl et al., 2006). De studerte artene er *Tapes semidecussatus* og *Scophthalmus maximus*. De celletypene/vevene som undersøkes er hemocytter, gjeller, fordøyelsesvev, blod, gjeller, lever. Referanseområde er Ballymacoda estuariet. Organismene ble eksponert til sedimentekstrakt i 3 uker.

Studier som har studert DNA-skade i forurensede områder er vist i **Tabell 2**. De artene som er undersøkt mest er *M. edulis* og *M. galloprovincialis*. Andre arter som flere av studiene har undersøkt er *B. azoricus* og *Cerastoderma edule*. En av studiene har estimert miljøforurensning i samme område i Mars/April, Mai/Juni, August og Desember (**Tabell 2**).

Tabell 2: Oversikt over hvilke områder, arter og celletype som har blitt undersøkt med comet assay der studiene sammenligner ulike områder og omfanget av DNA skade i arter fra rekken bløtdyr. *Studier som undersøker flere arter.

Art:	Område:	Referanseområde /er:	Celletype/r/ve v:	Undersøkes:	Kontroll:	Referanse:
<i>Bathymodiolus azoricus</i> , <i>Mytilus edulis</i>	Menez Gwen, Lucky Strike, Rainbow (mid Atlantic Ridge)	Whitsand Bay, S.E. Cornwall, (Storbritannia)	Gjeller, Hemocytter	Hvordan arten <i>B. azoricus</i> håndterer det harde miljøet i dyphavsventilasjonsfau naen.	H ₂ O ₂ (<i>in vivo</i> og <i>in vitro</i> : 1 t ved 4 C) 100 µM	(Pruski & Dixon, 2003)*
<i>Bathymodiolus azoricus</i> , <i>Mytilus edulis</i> (kontroll)	Menez Gwen, Lucky Strike og Rainbow (mid Atlantic Ridge)	Hill Head, Hampshire, UK (<i>M. edulis</i>)	Gjeller, Mantel	HSP70 ble brukt som en biomarkør for sub-cellulært stress.	muslinger lagt i en uke uten mat i deres vanlige temp. 0.2 µg/L CdCl ₂	(Pruski & Dixon, 2007)*
<i>Cerastoderma edule</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Venerupis pullastra</i>	Corcubi3n estuarie: Corcubi3n og Concha (Spania)	NA	Hemocytter, Gjeller	Forurensning i estuarier omr3der	NA	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)*
<i>Cerastoderma edule</i> ,	Turpoint (1), Cove head (2), Jupiter	Bantham	Hemocytter	Unders3ker forurensning fra	NA	(Dallas et al., 2013)*

Art:	Område:	Referanseområde /er:	Celleteype/r/ve v:	Undersøkes:	Kontroll:	Referanse:
<i>Mytilus edulis</i>	Point (3), under the Tamar bridge (4), Neale Point (5) (England)			industriell aktivitet fra lokasjoner nær Tamar estuariet.		
<i>Cerastoderma edule</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Corcubión and A Concha, (Spania)	Akvakultur oppdrettsanlegg	Gjeller, Hemocytter	Undersøker to muslingsarter for vurderingen av forurensningsnivået i et estuarisk miljø.	NA	(Pereira et al., 2011)*
<i>Mytilus edulis</i>	New Brighton, Blackpool, Whitstable, River Swale and Port Quin, (Storbritannia),	Mars/Ap, Mai/Jun, Aug og Des	Fordøyelseskjertel	Forholdet mellom cytochrome P450 1A- og 2E-immunopositive proteiner, lipid peroxidation og DNA (SBs)	NA	(Shaw et al., 2004)
	Reykjavik havn (Island)	Hvalfjörður, (Island)	Hemocytter, Gjeller	Muslinger fra intertidal og subtidal soner i forurensede og referanseområder.	200 µM H ₂ O ₂ for 1 h ved 4 C	(Halldorsson et al., 2004)
			Gjeller	Lekkasje fra dumping steder (muslinger har blitt transplantert)	29, 64 d	(Rank et al., 2007)
	estuariet av New Brighton, Merseyside, (Storbritannia)	estuarie av Llandudno (LL), NorthWales.	Gjeller	Muslinger ble undersøkt fra et kontaminert område og et referanseområde for å se på eksisjon kapasiteten til musling gjeller mot en radiomerket sonde som inneholder den oksidative lesjonen 8-okso-dG (8-okso-deoksyguanosin). Fpg-modifisert comet assay ble tatt i bruk.	NA	(Emmanouil & Chipman, 2008)
	Tagus estuariet (Portugal)	NA	Gjeller	Sammenligner bioakkumulering og biomarkør responser I feltutplasserte muslinger før og etter begynnelsen av mudring operasjoner. Muslinger ble plassert i	NA	(Martins et al., 2012)

Art:	Område:	Referanseområde /er:	Celletepe/r/ve v:	Undersøkes:	Kontroll:	Referanse:
				bur + at de hadde referanse muslinger.		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Pasaport og İnciraltı, og Çandarlı havn (Aliğa).	Mars og september	Hemocytter, Gjeller	Forurensning fra industri/ avløpsvann	NA	(Kacar et al., 2016)
	Genova havn, (Italia)	Portofino	Gjeller	Etterforsker flere biomarkører i marine muslinger som har blitt transplantert i bur i 4 uker i en industrialisert havn.	NA	(Regoli et al., 2004)
	Lira og Ancoradouro, (Spania)	Valcovo strand i Arteixo by	Gjeller, Hemocytter	Undersøker PAH og skade etter oljesøl.	NA	(Fernandez-Tajes et al., 2011b)
<i>Mytilus trossulus</i> , <i>Protothaca staminea</i>	Green Island; Northwest Bay; og Herring Bay, Eleanor Is; og Bay of Isles, Knight Is (Storbritannia)	Port Chalmers og Cordova havn (positive kontroller)	Hemocytter	Exxon Valdez oljesøl to arter undersøkt for DNA skade etter 13 år	Referanse områdene er positive kontroller	(Thomas et al., 2007)*
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Bakar, Trogir, Vranjic and Split, Pula, Rijeka and Gruž	Lim, Mljet and Ston.	Hemocytter	Evaluerer forurensningsinnvirkningen på den genetiske variasjonen av <i>M. galloprovincialis</i> sine 10 populasjoner. Som har habitat i ulike forurensede områder.	Undersøkte to år fra hverandre 2008 og 2009.	(Stambuk et al., 2013)
<i>Mytilus sp.</i>	Pointe du Castelli, Pen Bron and Saint-Nazaire Havn, (Frankrike)	NA	Hemocytter, Gjeller	Estimerer DNA skade i gjelleceller og hemocytter i 3 forurensede områder.	NA	(Akcha et al., 2004)
<i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Thames, Tees, Test, Clyde estuarier	Lunderston Bay	Hemocytter	Biologiske effekt teknikker for å sjekke helsen til muslinger. Undersøker på ulike områder.	NA	(Brooks et al., 2009)*
<i>Mytilus edulis</i> , <i>Carcinus</i>	Drøbak (Norge)	NA	Hemocytter, coelomocytter,	Formålet med studien var å kvantifisere baseline nivåer av	H ₂ O ₂ (25-250 µM)	(Sahlmann et al., 2017)*

Art:	Område:	Referanseområde /er:	Celletype/r/ve v:	Undersøkes:	Kontroll:	Referanse:
<i>maenas</i> , <i>Asterias rubens</i> , <i>Ciona intestinali</i> , <i>Gadus</i> <i>Morhua</i>			hvite blodceller	DNA-trådbrudd i marine organismer fra fire rekker og å vurdere relativ sensitivitet til oksidativt stress og evnen til reparering.		
<i>Octopus vulgaris</i>	øff Matosinhos og øff Olhao (Portugal)	NA	Kjertel, Gjeller, Nyre, Gonader	Undersøker basal DNA skade i fordøyelseskjertelen, gjeller, nyrer, og gonader av <i>Octopus vulgaris</i> i to områder som er påvirket av utslipp fra elver, by, industri og agrikultur.	NA	(Raimundo et al., 2010)
<i>Perna viridis</i>	Karwar, Mangalore and Calicut	Referanse (står ikke fra hvor)	Fordøyelsesceller, Hemocytter	Teste biologiske responser til stress.	NA	(Krishnakumar et al., 2006)

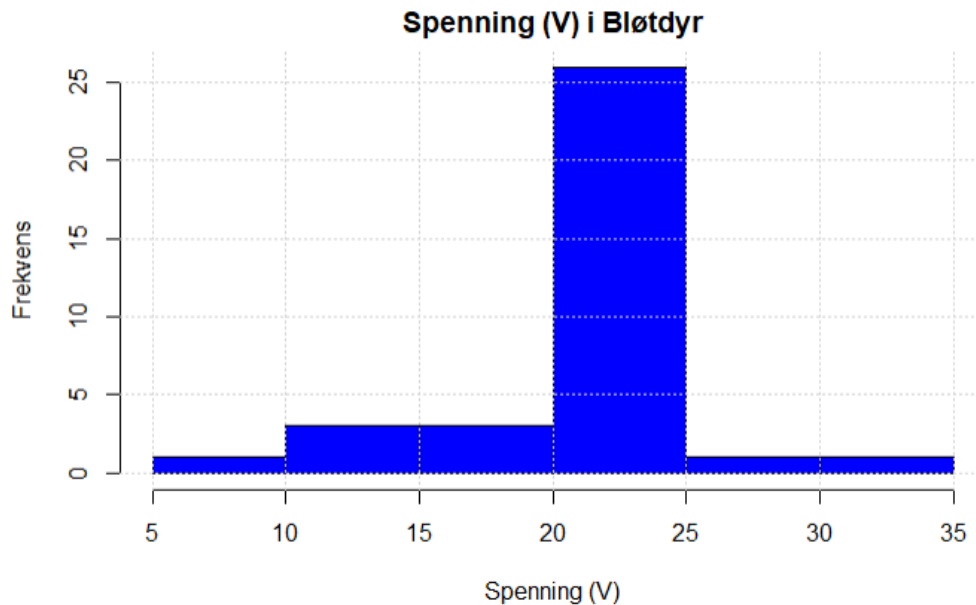
3.1.2 Lagring av prøver

De fleste studiene har lagret prøvene på is/kjølig, men ikke hvor lenge de har lagret prøvene på is. Noen av studiene har skrevet at de har tatt i bruk prøvene rett etter analysen (Halldorsson et al., 2004; Mamaca et al., 2005; Pruski & Dixon, 2003). Samtlige studier har ikke notert tiden for lagring av prøver på, men at prøvene har blitt lagret på is/kjølig eller i flytende nitrogen fram til bruk i analysen (Akcha et al., 2004; Al-Subiai et al., 2011; Alnajjar et al., 2021; Fernandez-Tajes et al., 2011a; Fernandez-Tajes et al., 2011b; Pereira et al., 2011; Shaw et al., 2004). Andre har lagret prøvene på is/kjølig eller i flytende nitrogen (Dallas et al., 2013; Dixon et al., 2004; Frenzilli et al., 2004; Pruski & Dixon, 2007; Regoli et al., 2004; Sahlmann et al., 2017; Shaw et al., 2004; Siu et al., 2004; Thomas et al., 2007; Tran et al., 2007). De resterende studiene har ingen notater om prøvene er lagret på is/kjølig (Al-Shaeri et al., 2013; Brooks et al., 2009; Emmanouil & Chipman, 2008; Krishnakumar et al., 2006; Lewis & Galloway, 2009; Martins et al., 2012; Singh & Hartl, 2012; Stambuk et al., 2013).

3.1.3 Lysering og elektroforese

Alle studiene har brukt lyseringsbuffer pH 10 eller ikke nevnt hvilken pH de har brukt. De fleste studiene har inkubert cellene i lyseringsbuffer i 1 time (Vedlegg B), de andre tidene er 40 minutter, 1.5 timer, 2 timer, over natten og 4 uker.

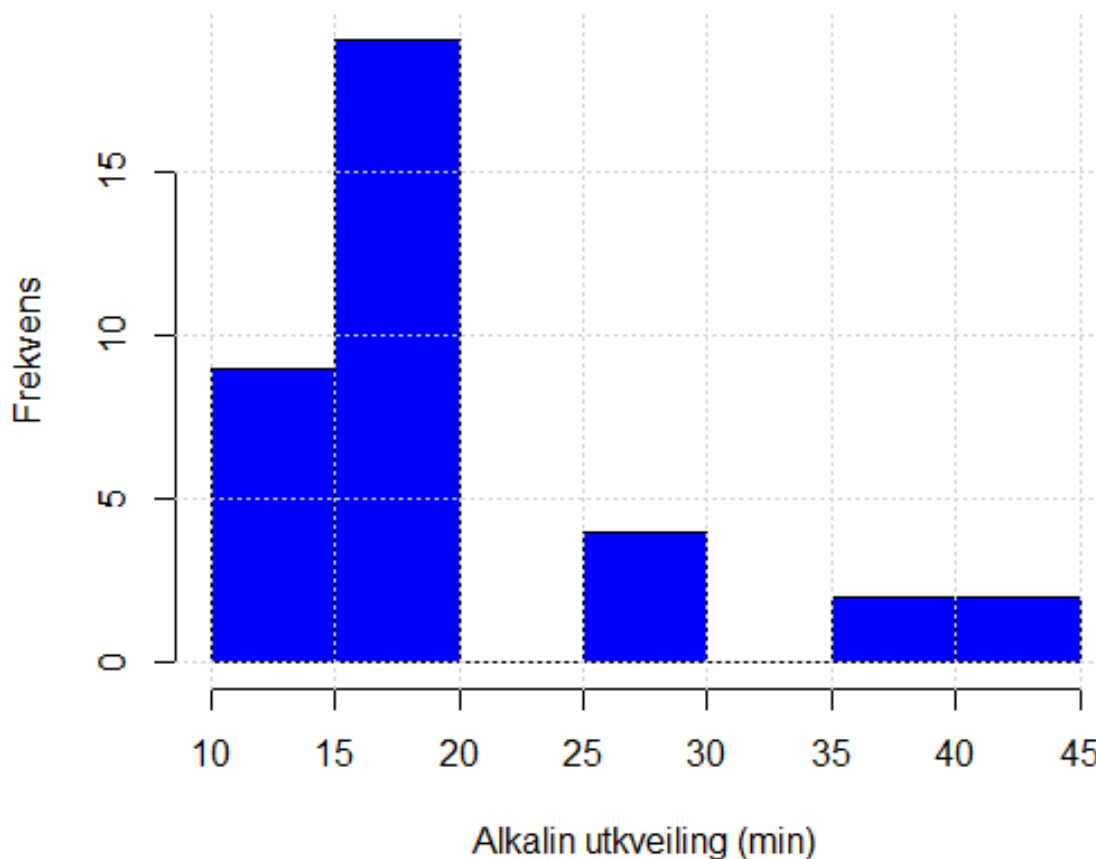
En oversikt over hvilken spenning som er mest vanlig å bruke er vist i **Figur 3**.



Figur 3: Histogram over hvilken spenning (V) som har blitt brukt mest i studier med bløtdyr.

Alle studiene bruker strøm (mA) som er på 300 mA, med unntak av Dallas et al. (2013), som har brukt 320 mA og Akcha et al. (2004) som har brukt 390 mA. Noen av studiene nevner ikke hvilken strøm de har brukt (Pruski & Dixon 2007; Martins et al., 2012; Sahlmann et al., 2017; Raimundo et al., 2010). Tid for utkveiling varierte med 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min og 45 min (**Figur 4**). Elektroforesetiden varierte med 5, 15, 20, 25 og 30 min (Vedlegg A).

Alkalin utkveiling (min) i Bløtdyr



Figur 4: Histogram som viser variasjoner i alkalin utkveilingstid i de undersøkte studiene.

3.1.4 Scoring

I kategorien scoring varierer studiene mellom å oppgi resultatene av graden av DNA skade som median og gjennomsnitt. Studiene oppgir resultatene i ulike parametere der «%Tail DNA» er brukt mest. Andre parametere som har blitt brukt er OTM, TM og TL.

Gjeller har for det meste mer DNA-skade enn hemocytene (**Tabell 1, 2 og 3**).

I studien gjort med *B. azoricus* (Dixon et al., 2004), er det svært liten forskjell mellom resultatet fra den negative kontrollen og resultatet fra eksponering til økende trykk og temperatur (7-8.5 °C) variasjoner (**Tabell 3**). I de studiene som har undersøkt Cu, Cd, B[a]P og Hg er det en betydelig større DNA-skade i resultatene enn i kontrollene (Siu et al., 2004; Tran et al., 2007; Lewis & Galloway, 2009; Al-Subiai et al., 2011; Sarkar et al., 2015).

«%Tail DNA» har blitt brukt som parameter i alle studiene gjort med laboratorieforsøk (Tabell 3) Single-walled carbon nanotubes (SWCNT) i samhandling med metallene Cd og Zn har en betydelig større DNA-skade enn i samhandling med kun Cd eller Zn (Tabell 3).

Tabell 3: Oversikt over resultater fra scoring i laboratorieforsøk der en har undersøkt hvordan miljøgifter/stressorer påvirker DNA-skade i ulike celler i bløtdyr. Alle studiene har brukt %Tail DNA som parameter. Omregnet til %Tail DNA*. Lest av graf**. Brukt referanseområde som kontroll. ¹Grafen med den positive kontrollen CdCl₂ har ikke skrevet ned hvilke celler/vev resultatene stammer fra.

Art:	Celleteype/vev:	Miljøgift/er:	Resultat:	p.k/n.k:	Referanse:
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Hemocytter	Trykk og temperatur variasjoner	20%**	35%**/20%**	(Dixon et al., 2004)
	Gjeller		27%**	43%**/25%**	
<i>Mytilus edulis</i>	Sædceller	MMS og B[a]P	21%** og 4%**	NA/23%**	(Lewis & Galloway, 2009)
	Hemocytter		40%**	NA/11%**	
	Hemocytter	Styrene	18%	NA/10%	(Mamaca et al., 2005)
	Hemocytter	Cu	57%	NA/8%	(Al-Subiai et al., 2011)
	Hemocytter	SWCNT+Cd , SWCNT+Zn ,S WCNT+Cd+Zn	(17%, 15%, 45%) **	21%**/4.5%**	(Al-Shaeri et al., 2013) ¹
	Gjeller		(17%, 15%, 51%) **		
	Hemocytter	HgCl ₂	61.1%	39.5%/9.8%	(Tran et al., 2007)
	Gjeller	Saltholdighet	6.51%	NA/5.40%	(Singh & Hartl, 2012)
	Hemocytter		3.98%	NA/4.22%	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hemocytter	Lo	24.8%	14%/2%	(Alnajjar et al., 2021)
<i>Nerita chamaeleon</i>	Gjeller	CdCl ₂	53.54%	33%**/15.6%	(Sarkar et al., 2015)
<i>Perna viridis</i>	Hemocytter	B[a]P	52%**	NA/20%**	(Siu et al., 2004)

Oversikten over de studiene som har undersøkt hvor stor DNA-skaden er i forurensede områder er vist i Tabell 4. Der celler og vev har blitt studert er hemocytter, mantel og gjeller. I de studiene som både har undersøkt hemocytter og gjeller har gjellene for det meste høyere DNA-skade (Tabell 4). En av studiene har undersøkt forskjeller i DNA-skade i store muslinger og i små muslinger Pruski and Dixon (2003), begge resultatene er skrevet i Tabell 4. En annen studie har samlet inn prøver gjennom to innsamlingsperioder (Pereira et al., 2011) (se Tabell 4).

Tabell 4: Oversikt over de studiene som har undersøkt omfanget av DNA skade i ulike områder. Omregnet til %Tail DNA er markert med*. Lest av graf**. ¹Har ikke skrevet ned resultatene fra den positive kontrollen og sier ikke noe om hvilke celler som grafen for DNA skade går ut ifra. ²Store muslinger (små muslinger) ³ Innsamlingsperiode 2 (Innsamlingsperiode 1).
⁴Resultatene er oppgitt i gjennomsnitt.

Art:	Parame- ter oppgitt:	Celletype:	Område:	Resultat:	Ref.områ- de:	p.k:	Referanse:	
<i>Asterias rubens</i>	%Tail DNA	Coelomocytter	Drøbak	34%	NA	91%	(Sahlmann et al., 2017)	
<i>Bathymodiolus azoricus</i>		Gjeller	Menez Gwen	65%**	NA	NA	(Pruski & Dixon, 2007) ¹	
			Lucky Strike					
			Rainbow					
		Mantel	Menez Gwen					
			Lucky Strike					
			Rainbow					
		Hemocytter	Menez Gwen	38.0±5.8% (56.1±9.7%)	15***% (12***%) M. edulis: 12***%	58***% (13***%)	(Pruski & Dixon, 2003) ²	
			Lucky Strike	21.4±4.5% (39.5±7.0%)				
			Rainbow	15.8±1.4% (27.8±6.6%)				
Gjeller	Menez Gwen	55.4±5.5% (39.3±5.4%)	40***% (22***%)	66***% (40***%)				
	Lucky Strike	36.7±4.0% (23.7±4.0%)						
	Rainbow	27.8±6.6% (23.4±3.8%)						
<i>Carcinus Maenas</i>		Coelomocytter	Drøbak	25%	NA	83%	(Sahlmann et al., 2017)	
<i>Cerastoderma edule</i>		Hemocytter	Corcubion	1.435 ± 0.126% (1.529 ± 0.140%)	0.186 ± 0.026%	NA	(Pereira et al., 2011) ³	
			A Concha	1.120 ± 0.142% (1.261 ± 0.131%)				
		Gjeller	Corcubión	2.508 ± 0.193% (1.049 ± 0.077%)	0.216 ± 0.199%			
			A Concha	1.911 ± 0.139% (0.913 ± 0.077%)				
		Hemocytter	Corcubión	1.5291 ± 0.1396%	0.1858 ± 0.0259%	NA	(Fernandez -Tajes et al., 2011a)	
			A Concha	1.2606 ± 0.1313%				

Art:	Parame-ter oppgitt:	Celletype:	Område:	Resultat:	Ref.område:	p.k:	Referanse:
		Gjeller	Corcubión	0.8773 ± 0.1261%	0.2164 ± 0.0200%		
			A Concha	0.9130 ± 0.0777%			
	TM, TL	Hemocytter (TM)	1	1.5**	NA	NA	(Dallas et al., 2013) ⁴
			2	1.6**			
			3	1.6**			
			4	1.9**			
			5	1.0**			
			6	1.7**			
<i>Ciona intestinalis</i>				17%			(Sahlmann et al., 2017)
<i>Mytilus edulis</i> (Kontroll)		Hemocytter (TM, TL)	1	1.8**, 20** (9%*)			(Dallas et al., 2013) ⁴
			3	2**, 12** (16%*)			
			4	1.5**, 15** (10%*)			
			5	1.5**, 12** (12.5%*)			
			6	2**, 25** (8%*)			
	%Tail	Hemocytter	NA	NA	12%**	30%**	(Pruski & Dixon, 2003)
	DNA	Gjeller		NA	15%**	32%**	
		Fordøyelseskjertel *	New Brighton	13 ±0.5%	NA	NA	(Shaw et al., 2004)
			Blackpool	13.5 ±0.5%			
			Whitstable	17 ±0.3%			
			River Swale	16±0.2%			
			Port Quin	22±1%			
		Gjeller*	Reykjavik	41%	30%	50%	(Halldorsso
		Hemocytter*	havn	35%	27%	81%	n et al., 2004)
		Gjeller	Merseyside, (Storbritannia)	NA	Llandudno , (Storbritannia)	NA	(Emmanouil & Chipman, 2008)
		Gjeller	Tagus estuarie	75%	5%	NA	(Martins et al., 2012)
		Gjeller	Menez Gwen,	Positiv	NA	NA	(Pruski & Dixon, 2007) ¹
		Mantel	Lucky strike	respons (65%)			
	TM	Gjeller (innfødte muslinger)	Ferring	(4)	1.33±0.23	NA	(Rank et al., 2007)
			Høfde 42	7 (6)			
			Høfde 43	8			

Art:	Parame-ter oppgitt:	Celletype:	Område:	Resultat:	Ref.område:	p.k:	Referanse:
			Gammel fabrikk område	10.1			
			Rønland øst	6 (13)			
			Rønland sør	2 (12)			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	%Tail DNA	Hemocytter	Drøbak	22%	NA	92%	(Sahlmann et al., 2017)
		Gjeller	Pasaport	34.60%	NA	NA	(Kacar et al., 2016)
			Inciralti	21.64%	20.92%		
			Candarli	NA	25.83%		
		Hemocytter	Pasaport	34.15%	NA	NA	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)
			Inciralti	18.05%	11.48%		
			Candarli	NA	24.41%		
		Hemocytter	Corcubión	1.0382 ± 0.049%	0.4804 ± 0.042%	NA	(Pereira et al., 2011) ³
			A Concha	1.8078 ± 0.1410%			
		Gjeller	Corcubión	1.8794 ± 0.1510%	0.8260 ± 0.045%	NA	(Regoli et al., 2004)
			A Concha	1.8975 ± 0.099%			
		Hemocytter	Corcubión	0.951 ± 0.058% (1.038 ± 0.068%)	0.329 ± 0.032%	NA	(Stambuk et al., 2013)
			A Concha	2.096 ± 0.098% (1.808 ± 0.200%)			
		Gjeller	Corcubión	1.955 ± 0.099% (1.879 ± 0.151%)	0.826 ± 0.553%	NA	(Stambuk et al., 2013)
			A Concha	1.833 ± 0.090% (1.897 ± 0.099%)			
		Gjeller	Genova havn	45%	25%	NA	(Regoli et al., 2004)
		Hemocytter**	Lim	(2008): 15%	(2009): 2%	NA	(Stambuk et al., 2013)
			Mijet	2%	2.5%		
			Ston	3%	3%		
			Bakar	1.5%	3.5%		
Trogir	2%		5%				
Vranjic	2%		3%				
Split	2%		3%				
Pula	2%		5%				
Rijeka	2%	1.5%					

Art:	Parame-ter oppgitt:	Celletype:	Område:	Resultat:	Ref.område:	p.k:	Referanse:		
			Gruz	15%	7.5%				
	TL	Gjeller	Lira	36.50 ± 0.49,	19.87 ±	NA	(Fernandez-Tajes et al., 2011b)		
Ancoradoiro			36.60 ± 0.43	0.46					
Hemocytter		Lira	36.31 ± 0.34	31.97 ±					
		Ancoradoiro	44.34 ± 0.46	0.37					
<i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i>	TM	Hemocytter	Test	10	45	NA	(Brooks et al., 2009)		
			Thames	51					
			Tees	11					
			Clyde	42					
<i>Mytilus trossulus</i>	TM	Hemocytter*	Green Island	2.1	1.7	2.2, 4	(Thomas et al., 2007)		
			Northwest bay	1.5	1.6				
			Herring bay	1.4	0.1				
			Bay of Isles	1.2	0.7				
<i>Mytilus sp.</i>	OTM	Gjeller		5.10±0.06	NA	NA/NA	(Akcha et al., 2004)		
		Hemocytter		4.90±0.06					
<i>Octopus vulgaris</i>	%Tail DNA	Fordøyelsesceller	Matosinhos	85%	NA	NA/NA	(Raimundo et al., 2010) ⁴		
			Olhao	72%					
		Gjeller	Matosinhos	70%					
			Olhao	15%					
		Nyre	Matosinhos	38%					
			Olhao	30%					
		Gonader	Matosinhos	30%					
			Olhao	25%					
<i>Perna viridis</i>		Fordøyelsesceller	Karwar	9±3%	8±%	NA	(Krishnakumar et al., 2006)		
			Mangalore	11±4%	10±2%				
		Hemocytter	Calicut	9±3%	10±2%				
<i>Protothaca staminea</i>	TM	Hemocytter	Northwest bay	2	NA	Port chalmers: 2	(Thomas et al., 2007)		
			Herring bay	2					
			Bay of Isles	2					
<i>Venerupis pullastra</i>	%Tail DNA	Hemocytter	Corcubión	0.5144 ± 0.0468,	0.0919 ± 0.0070	NA	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)		
			A Concha	0.4855 ± 0.1132					
			Gjeller	Corcubión				0.8773 ± 0.1261	0.1000 ± 0.0072
				A Concha				0.9437 ± 0.1315	

Det er en studie som har undersøkt hvordan sedimentekstrakt fra et forurenset område har å si på DNA-trådbrudd i to arter og i tre ulike celletyper (Hartl et al., 2006). I denne studien har

«Tail DNA» blitt brukt som parameter. Denne studien undersøkte DNA-trådbrudd i artene *T. semidecussatus* og *S. maximus*. Den høyeste skaden i *Tapes semidecussatus* lå henholdsvis på; hemocytter: 28%, gjeller: 28% og lever/fordøyelsesceller: 33% og i Piggvar (*Scophthalmus maximus*) lå den på; blodceller: 23%, gjeller: 23% og lever/fordøyelsesceller: 25% der resultatene har blitt tolket fra grafer. Kontrollen her er at de har tatt sedimentekstrakt fra et referanseområde og de har også undersøkt DNA-trådbrudd før fisken ble eksponert for sedimentekstrakt. Den høyeste skaden som ble registrert med sedimentekstrakt fra referanseområde var: *T. semidecussatus*: hemocytter 25%, gjeller: 23% og lever/fordøyelsesceller 18% og *S. maximus*: blodceller: 12%, gjeller: 12% og lever/fordøyelsesceller 15%. Som en kontroll ble det også tatt prøver av artene uten eksponering av sedimentekstrakt *T. semidecussatus*: hemocytter: 24%, gjeller: 25% og lever/fordøyelsesceller: 15% og *S. maximus*: blodceller: 10%, gjeller: 10% og lever/fordøyelsesceller: 7%. Det er høyere bakgrunnsnivåer av DNA-skade i *T. semidecussatus* enn i *S. maximus*.

3.2 Fisk

Søket ble utført og resultatene hentet ut 19.04.2023. Av de 37 resultatene som ble hentet ut, var det 8 artikler som ble ekskludert da studiene var gjort på ferskvannarter og dermed ikke oppfylte kriteriene. Studier gjort på cellelinjer i *Cyprinus carpio L.* som er en ferskvannart er tatt med i utvalget. Dette er fordi det som undersøkes er sedimentprøver fra Nordsjøen som er marint område.

3.2.1 Design og prøvetakning

Oversikt over laboratorieforsøk er vist i **Tabell 1**. Her har det blitt undersøkt 6 ulike arter. De stoffene som har blitt undersøkt er Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) og Polyklorerte bifenyler (PCB) i pellets, fenantren, olje, kadmiumklorid (CdCl_2), gull-nanopartikler (AuNPs), gemfibrozil og styren. Eksponeringstiden varierer fra 8 timer til 29 dager. Alle studiene har eksponert organismene for miljøgifter/stressorer i tanker med vann. En av studiene har eksponert to grupper med organismer (Dupuy et al., 2014), de er markert som forurenset gruppe 1 og 2.

Tabell 5: Oversikt over hvilke/en områder, arter, celletype, kjemikalier/miljøgifter og dosering som har blitt undersøkt ved bruk av comet assay i laboratorieforsøk. n.k= negativ kontroll, p.t = positiv kontroll. C1: forurenset gruppe 1. C2: Forurenset gruppe 2.

Art:	Område:	Celletype:	Kjemikalie/stressor:	Kontroll:	Dose/kons. Intervall:	Eksponering stid:	Referanse :
Hippocampus reidi	Kommersiell e klekkeri (Lab: Espírito Santo, Brazil)	Blod	Olje, HYP og Olje+HYP	Normoxia (6.0 mg O2/L)	(18 mL/L av vann, 1.5 mg O2/L) i 6 L tanker	8 t	(Negreiros et al., 2011)
Platichthys flesus	fiskebruk (Fiske laboratorium, Danmark)	Erythrocytter	PAH og PCB i pellets	PAH: 12 ng/g, PCB: 16.6 ng/g	C1: 795, 421.9 ng/g, C2: 9268, 4720.6 ng/g	14 d, 29 d	(Dupuy et al., 2014)
Oreochromis mossambicus	fiskebruk, (India)	Leverceller	Fenantren løst i dimetylformamid med nitritt	uten nitritt	1 mg/l og 1 µM	6 d	(Shailaja et al., 2006)
Solea senegalensis	NA	Befruktede egg	CdCl ₂	N.k: (ASW), P.t: (H2O2)	(1.56 - 12.5) µg/L	48 t	(Pavlaki et al., 2016)*
Sparus aurata	lagune i Valle Ca' Zuliani srl (Rovigo, Italia)	Erythrocytter	CdCl ₂	kontroll uten eksponering	0.1 mg/l	4, 11 dager (0,4,11 på kontroll)	(Isani et al., 2009)
	Spansk akvakultur fasilitet	Erythrocytter	AuNPs, GEM, AuNPs+GEM	H ₂ O ₂ : 25 µM i 10 min	(4- 1600) µg/L AuNPs, 150 µg/L GEM, AuNPs+GEM: 80+150 µg/L	96 t	(Barreto et al., 2019)
Symphodus mellops	Byfjord, (Stavanger)	Blod	Styren	kontroll tank	2 mg/L	7 d	(Mamaca et al., 2005)

En oversikt over de studiene som har brukt sedimentekstrakt fra ulike områder for å undersøke DNA-skade ved bruk av Comet Assay vist i **Tabell 5**. De celletypene som har blitt undersøkt er leukocytter, cellelinjer med gjeller tatt fra *Paralichthys olivaceus* og cellelinjen Epithelioma papulosum cyprini (EPC) tatt fra en hudsvulst i karpene *Cyprinus carpio L. C*. Alle studiene som har brukt cellelinjer har eksponert cellene i 24 timer utenom Yang et al. (2010), som har eksponert cellene i 0-96 timer. Fire ulike arter har blitt undersøkt i studiene gjort med sedimentekstrakt.

Tabell 6: Oversikt over hvilke/en områder, arter, celletype, om det har blitt gjennomført in vivo eller in vitro eksponering av sedimentekstrakt for å så å undersøke DNA-skade ved bruk av Comet Assay. N.k.: negativ kontroll, p.k.: Positiv kontroll.

*Brukt referanseområde. EPC = *Epithelioma papulosum cyprini*.

Art:	Område:	Celletype:	Konsentrasjon:	Eksponeringstid:	n.k/p.k:	In vivo/In vitro:	Referanse:
<i>Cyprinus carpio</i>	Nordsjøen	Leukocytter	0.1%	24 t	H2O2 (0.001-1 µL PBS)	In vitro	(Kammann et al., 2000)
	Nordsjøen, Iberian sjøen* (Portugal)	Cellelinje (EPC)	1%	24 t	Ja/ B[a]P (2.5-25 ng)	In vitro	(Kammann et al., 2001)
	Nordsjøen og Østersjøen	Cellelinje (EPC)	1%	24 t	NA	In vitro	(Kammann et al., 2004)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Li Cang (LC), Zhan Qiao (ZQ) and Olympic Sailing Center (OSC). Jiaozhou bukt av Gulehavet	Cellelinjer (gjeller)	(5-200) mg dry weight/ml	0-96 t	NA	In vitro	(Yang et al., 2010)
<i>Poeciliopsis lucida</i>	Kvarnerbukta	PLHC-1 cellelinje	0.08-20 mg/mL	24 t	Ikke-eksponerte celler/NA	In vitro	(Šrut et al., 2011)
<i>Scophthalmus maximus L.</i>	Aghada*, whitegate (Cork Harbor), Irland	Lever, Gjelle, Epidermal, Milten, Blod	1-2 cm i 500 L sjøvann	(7,14,21) d	NA/CdCl ₂ (0.08 og 0.8 µg/L)	In vivo	(Kilemade et al., 2004)

De studiene som har sammenlignet DNA-skade fra to eller flere områder er vist i **Tabell 7**. De celletypene som har blitt undersøkt mest er erythrocytter, men det er også blitt undersøkt lever, gjeller, muskler, nyrer, tarm og gonader.

Tabell 7: Oversikt over hvilke områder, arter og celletype som har blitt undersøkt med Comet Assay. * markerer at det har blitt brukt et referanseområde.

Art:	Område:	Referanseområde/er:	Celletype:	Undersøkes:	p.k/n.k:	Referanse :
<i>Cathorops spixii</i>	Paranaguá Bay, Brasil (etter oljesøl)	Paranaguá Bay, Brasil (før oljesøl)	Blod	Oljesøl	NA/NA	(Katsumiti et al., 2009)
<i>Conger conger</i>	Southern Adriatic Sea	Tyrrhenian Sea	Lever, Gjeller, Muskler, Nyrer, Tarm og Gonader	Yperite/CWAs (Krigføringsforbindelser)	NA/NA	(Della Torre et al., 2013)
<i>Coris julis</i>	Milazzo	Marinello	Erythrocytter	Forurensning i vannet	NA/NA	(Fasulo et al., 2010)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Vranjic, Trogirbukta (Fisk ble tatt fra fiskebruk og plassert her).	Nečujambukta, Trogirbukta	Erythrocytter	Urenset kommunalt avløpsvann som ender opp i The Kaštela Bay	NA/NA	(Srut et al., 2010)
<i>Helicolenus dactylopterus</i> , <i>Conger conger</i>	sørlige Adriaterhavet	Sørlige Tyrrenhavet	Gjeller, Lever, Muskel, Nyre, Tarm og Gonader	Effekt på bentiske fisk på et kjemisk krigføringsmiddel dumpingplass.	H2O2 (in vitro)/ NA	(Della Torre et al., 2010)
<i>Limanda limanda</i> , <i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Firth of Forth (FoF), Ekofisk (EF), Dogger Bank (DB) og German Bight (GB)	Island SE (ISE), Island SW (ISW)	Blodceller	DNA-trådbrudd i <i>Limanda limanda</i> og <i>Melanogrammus aeglefinus</i> fra to lokasjoner på Island og fra Dogger bank.	NA/NA	(Hylland et al., 2017)
<i>Micropogonias furnieri</i>	Patos Lagune, Brasil	NA	Blod	Analysering av biomarkører i trommefisker fra forurensede og ikke-forurensede områder fra estuarie	NA/NA	(Amado et al., 2006a)
<i>Mugil curema</i>	(Goiana, Jaguaribe, Capibaribe, Sirinhaém, and Formoso) in Pernambuco State, (Brasil)	NA	Erythrocytter	vannforurensning i et område som har blitt utsatt for utslipp av ubehandlet kloakk.	NA/NA	(Lima et al., 2019)
<i>Paralichthys orbignyanus</i>	Coroa do Boi	Saco do Justino	Erythrocytter	Biomarkører av eksponering og effekten av	NA/NA	(Amado et al., 2006b)

Art:	Område:	Referanseområde/er:	Celletepe:	Undersøkes:	p.k/n.k:	Referanse :
				miljøgifter ble analysert i flyndrer.		
<i>Periophthalmus waltoni</i>	Ameri Port, Soltani Inlet, Shif Island (Persian golf)	NA	Gjeller	Fem forskjellige biomarkør responser ble valgt for å se på detoksifiseringsprosessen i en slamkryper fra ulike stasjoner langs kysten.	NA/NA	(Shirani et al., 2012)
<i>Platichthys flesus</i>	Biscayabukta (Frankrike)	NA	Erytrocytter	Beskrive og modellere variasjonsmønstre i individuelle fiskeresponser til miljøgifter innad i estuarier, sesong og kjønn.	NA/NA	(Laroche et al., 2013)
	Villaine elvemunning (Frankrike)	NA	Erytrocytter	Fysiologiske og genetiske responser til flyndren ble	NA/NA	(Evrard et al., 2013)
<i>Platichthys flesus</i> , <i>Limanda limanda</i> ,	Seine elvemunning og Parfond (Frankrike)	NA	Erytrocytter	Et rammeverk har laget et rammeverk for å validere applikasjonene av kjemikalier og biologiske vurderingsterskler i Seinebukta i Frankrike. DNA-trådbrudd ved bruk av comet assay og andre analyser ble analysert i fire marine arter (<i>Platichthys flesus</i> , <i>Limanda limanda</i> , <i>Mytilus sp.</i> og <i>Nucella lapilus</i>).	NA/NA	(Burgeot et al., 2017)

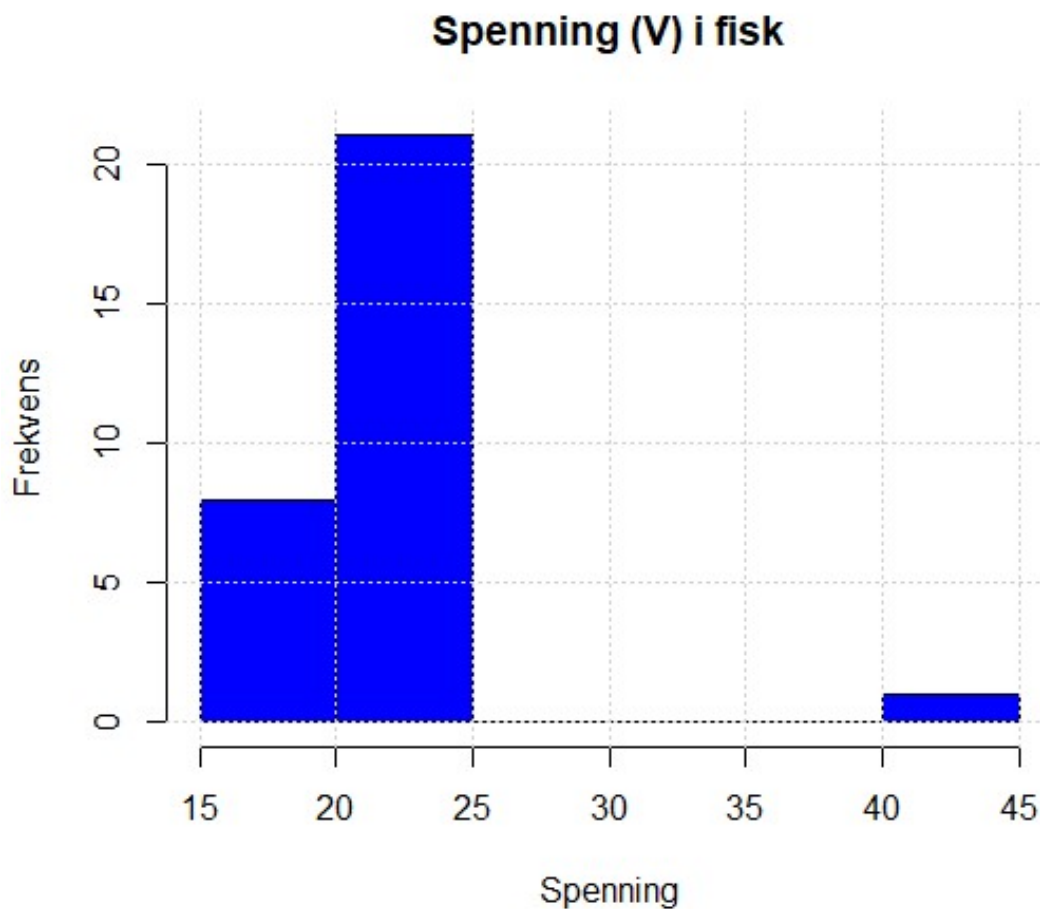
3.2.2 Lagring av prøver

Ingen av artiklene tar for seg hvor lenge de har hatt prøvene på is innen innstøping, men noen artikler skriver at prøvene ble preparert «umiddelbart» til Comet Assay (Amado et al., 2006a; Mamaca et al, 2005; Marques et al., 2014; Negreiros, 2011; Srut et al., 2010).

3.2.3 Lysering og elektroforese

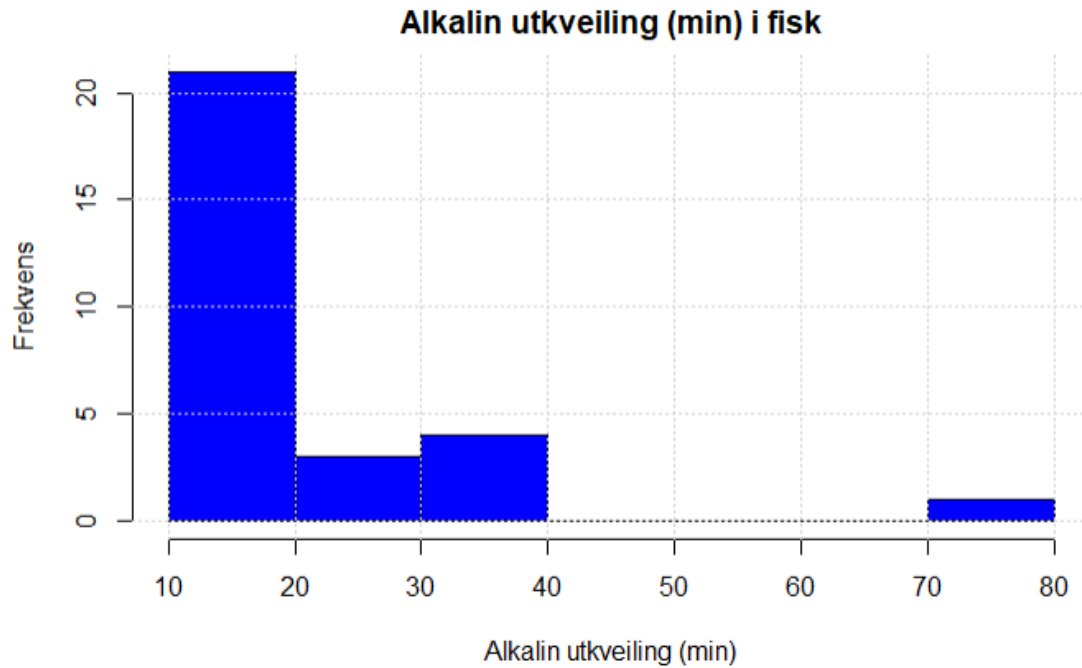
Alle studiene har hatt en pH = 10 på lyseringsbuffer. De fleste studiene har inkubert cellene i 1 time i lysis buffer, imens andre studier har hatt > 1 timer, 1.5 timer, 2 timer, 3 timer, over natt og en studie har lagt prøvene i lysis buffer i 10-26 dager (se Vedlegg B).

I elektroforesen har det for det meste blitt brukt spenning 25 V, det blir også brukt 15 V, 20 V, 22 V, 23 V og 43 V (**Figur 5**).



Figur 5: Histogram over hvilken spenning (V) som har blitt brukt mest i studier med fisk.

Alle studiene har brukt samme strøm på 300 mA med unntak av noen få studier som har brukt 140, 240 og 390 mA. Alle studiene har hatt basisk elektroforesebuffer som varierer mellom 12 til over 13 i pH. Tid for elektroforese varierer fra 15 til 30 min (se Vedlegg A). Tid for utkveiling av DNA varierer fra 15 min til 80 min (**Figur 6**).



Figur 6: Histogram over hvilken alkalin utkveilingstid som har blitt brukt mest i studier med fisk.

3.2.4 Scoring

Gjellecellene er for det meste har en større grad av DNA-skade enn erytrocyttene. De fleste studiene har undersøkt erytrocytter, noen har også undersøkt leverceller, epidermis og milt. I noen av studiene gjort på fisk har en skala fra 0-3 blitt brukt, der 300 er maksimal DNA-skade der 100 celler blir scoret (Negreiros et al., 2011; Shailaja et al., 2006). DNA-skade er større i eksponerte grupper enn i kontrollene i de studiene som har brukt visuell scoring som parameter (**Tabell 8**).

Tabell 8: Oversikt over scoring resultatene til de studiene som har blitt gjennomført i laboratorium. Verdier er lest av graf*. Verdier er regnet om til %Tail DNA**.

Art:	Parameter oppgitt:	Celletype/vev:	Miljøgift/er:	Resultat:	p.k/n.k:	Referanse:
Hippocampus reidi	Visuell scoring (0-3)	Blod	Hypoksi	118.3±19.3	NA/ 4.5±1.3	(Negreiros et al., 2011)
			Olje	134.5±19.4		
			Hypoksi + Olje	194.0±9.1		
Oreochromis mossambicus		Leverceller	Nitritt+ fenantren	277	(Nitritt: 23, Fenantren: 35)/NA	(Shailaja et al., 2006)
Platichthys flesus	%Tail DNA	Erytrocytter*	Fiskepellets:		19%/NA	(Dupuy et al., 2014)
			PAH: 795 ng/g PCB: 421.9 ng/g	27%		
			PAH: 9268 ng/g Og PCB: 4720.6 ng/g	32%		
Solea senegalensis	% DNA-skade, Visuell scoring (0-4)	Befruktede egg	Cd+	45%	NA/ 30%	(Pavlaki et al., 2016)
Sparus aurata	TL, %Tail DNA, TM	Erytrocytter**	CdCl ₂	14.4%	NA/ 13.6%	(Isani et al., 2009)
	Visual scoring (0-4), TL	Erytrocytter	cAuNPs: 80 µg/L	194.0± 5.3	NA/ 27.2 ± 7.9	(Barreto et al., 2019)
			PVP-AuNPs: 1600 µg/L	267.4± 23.0		
			GEM: 150 µg/L:	264.8 ± 6.1.		

Art:	Parameter oppgitt:	Celletype/vev:	Miljøgift/er:	Resultat:	p.k/n.k:	Referanse:
			80 µg/L cAuNPs +GEM 150 µg/L:	280.3 ± 22.7		
			80 µg/L PVP- AuNPs+GEM 150 µg/L:	247.6 ± 18.2		
Symphodus mellops	%Tail DNA	Blod	Styrene	11±4%	NA/ 7± 2%	(Mamaca et al., 2005)

I studiene som har brukt visuell scoring som parameter er det mye større skade i celler som har blitt eksponert for sedimentekstrakt enn i de negative kontrollene (**Tabell 9**). En av studiene som har brukt visuell scoring har tatt vekk den siste klassen med DNA-skade (Kammann et al., 2000).

I studien som har brukt ara C som er en DNA reparasjonsinhibitor (Kammann et al., 2000), har den samme prøven med eller uten ara C er tatt med i tabellen, der høyeste skade uten å bruke ara C er regnet som høyeste gjennomsnittlige DNA-skade (**Tabell 9**).

Tabell 9: Oversikt over arter, parameter, celletype, resultat og resultat fra kontroller fra de studiene som har brukt eksponert celler for sedimentekstrakt. **Lest av graf. *Verdier som er omregnet til %Tail DNA. Ara C er en DNA reparasjons inhibitor. Område vil si det stedet som de har hentet sedimentekstraket fra. ¹uten ara C (med ara C).

Art:	Parameter oppgitt:	Celletype:	Område:	Resultat:	Ref.område :	p.k/n.k:	Referanse:
<i>Cyprinus carpio</i>	Visuell scoring (0-3(2)):	Leukocyter	Nordsjøen (KS11):	190 (200)	NA	Ja/17	(Kammann et al., 2000) ¹
			Nordsjøen (Ti13):	47 (91)			
			Nordsjøen (UE70):	76 (80)			
			Nordsjøen (WB5):	158 (26)			
	Visuell scoring:	Fiskelinjer (EPC)	Nordsjøen	299	44	150/40	(Kammann et al., 2001)
		Fiskelinjer (EPC)	Nordsjøen	300**	NA	NA/NA	(Kammann et al., 2004)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Visuell scoring (0-3):	Cellelinjer (gjelleceller)	LC	211 ± 5.5		NA/15 ± 4.2	(Yang et al., 2010)
			ZQ	154 ± 9.6		NA/18 ± 3.0	

			OSC	99 ± 6.7			NA/18 ± 6.0	
<i>Poeciliopsis lucida</i>	%Tail DNA	Erythrocytter	Kvarnerbukta	9.53%			B[a]P: 10 µM: 9.49%/NA EMS: 1000µM: 9.94%/NA	(Šrut et al., 2011)
<i>Scophthalmus maximus L.</i>		Epidermis*:	Aghada:	29%	22%	NA/ 11%	(Kilemade et al., 2004)	
			Whitegate	32%				
		Lever*:	Aghada:	21%	14%	39%/ 4%		
			Whitegate	24%				
		Blod*:	Aghada	17%	11%	45%/ 8%		
			Whitegate	24%				
		Milt*:	Aghada	19%	16%	NA/ 8%		
			Whitegate	21%				
Gjeller*:	Aghada	27%	14%	49%/ 10%				
	Whitegate	25%						

En oversikt over resultatene fra scoring til de studiene som har kvantifisert DNA-skade fra to eller flere forurensede områder er vist i **Tabell 10**.

Tabell 10: lest av graf**, regnet ut ved hjelp av TM og TL til %Tail DNA*, lest av graf og regnet ut ved hjelp av TM og TL til %Tail DNA. ¹Kun oppgitt data fra Conger Conger i gjeller. ²Oppgitt data i median. ND: Ikke bestemt/Not determined. p.k: positiv kontroll.

Art:	Parameter oppgitt:	Celleteype:	Område:	Resultat.	Ref.område:	p.k:	Referanse:
<i>Cathorops spixii</i>	Visuell scoring	Blodceller	Paranaguá bay (etter oljesøl)	180±21	Før oljesøl: 170±25, Etter oljesøl: 64.5±28	NA	(Katsumiti et al., 2009)
<i>Conger conger</i>	%Tail DNA	Gjeller	Sørilige Adriaterhavet	28.77%	NA	45%	(Della Torre et al., 2010) ¹
		Gjeller	Sørilige Adriaterhavet	28.51 ± 6.19%	0.8 ± 0.05%		(Della Torre et al., 2013) ¹
<i>Coris julis</i>	TL, TM	Erytrocytter	Milazzo	3.85%*	0.659%*		(Fasulo et al., 2010)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	%Tail DNA	Erytrocytter	Vranjic	10.84%	7.06%	NA	(Srut et al., 2010)
			Nečujam Bay	6.25%			
<i>Gadus Morhua</i>		Hvite blodceller	Drøbak	14%	NA		(Sahlmann et al., 2017)
<i>Limanda limanda</i>	-	Erytrocytter		ND	NA	NA	(Burgeot et al., 2017)
	%Tail DNA	Erytrocytter	FoF	30%	2%	(Hylland et al., 2017) ²	
			EF og GB	10%			
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>			FoF	>10%**	ISE: 50% ISW: >10%**		
<i>Micropogonias furnieri</i>	Visuell scoring	Blodceller	Patos lagune (Vinter, sommer)	101.67 ± 7.17, 99.4 ± 17.65	38.00 ± 5.83, 57.71 ± 11.85		(Amado et al., 2006a) ^a
<i>Mugil curema</i>		Erytrocytter	Juréia	15.3±8.3	NA	(Lima et al., 2019)	
			Goiana	42.1±2.8			
			Jaguaribe	20.6±6.8			
			Capibaribe	108.3±11,5			
			Sirinhaém	30.2±5.5			

			Formoso	14.6±3.9		
<i>Paralichthys orbignyanus</i>	TM	Erytrocytter	Coroa de Boi (Vår, Sommer, Høst)	185.94 ± 37.94, 152.32 ± 7.47, 232.24 ± 17.64	192.97 ± 18.53, 128.91 ± 7.87, 182.21 ± 10.14	(Amado et al., 2006b)
<i>Periophthalmus waltoni</i>	%Tail DNA	Gjeller	Soltani	33%,	NA	(Shirani et al., 2012)
			Shif Island	17%,		
			Ameri Port	13%**		
<i>Platichthys flesus</i>		Erytrocytter	NA	NA	NA	(Laroche et al., 2013)
	TM	Erytrocytter	Villaine (Januar, april, September, oktober, november, desember)	4, 4.2, 7, 8, 10, 12.	NA	(Evrard et al., 2013)
			Seine (November)	7		
			Seine estuary	15.5±10.5		
	%Tail DNA	Erytrocytter	Parfond	12.7 ±9.3		(Burgeot et al., 2017)

4 Diskusjon

Målet med oppgaven er å beskrive metodevariasjoner i studier som har brukt comet assay til å kvantifisere DNA skade i marine organismer og hvordan dette kan påvirke resultatene. De kategoriene som er undersøkt har vært design og prøvetakning, lagring av prøver, lysis/elektroforese og scoring.

4.1 Design og prøvetakning

De artene som har blitt studert mest fra rekken bløtdyr er *M. edulis* og *M. galloprovincialis*, (Se Tabell 1, 2 og 3), dette er arter som er mye brukt som bioindikatorarter (Jorgensen, 1996; Júnior et al., 2015). Det er en større grad av variasjon i de artene som er undersøkt i rekken fisk, der 20 ulike arter er undersøkt. Det er noen av disse som har blitt undersøkt mer enn andre og det er *L. limanda* og *P. Flesus*. I en av de studiene som undersøker DNA-skade i flere arter er det store forskjeller i DNA-skade mellom artene (Sahlmann et al., 2017) (se Tabell 4). Sahlmann og kolleger undersøkte DNA-skade hos fem ulike arter: *Mytilus edulis*, *Carcinus maenas*, *Asterias rubens*, *Ciona intestinalis* og *Gadus Morhua* med bakgrunn DNA-skade oppgitt i «%Tail DNA» på henholdsvis 22%, 25%, 34%, 17% og 14% (Sahlmann et al., 2017). Variasjonene viser til hvordan miljøforurensningen påvirker arter ulikt og at flere arter burde undersøkes for å få en bedre oversikt over faren ved forurensning.

I de studiene som har undersøkt både gjelleceller og hemocytter/erytrocytter er det for det meste høyest DNA-skade i gjelleceller (Tabell 3, 4 og 9). En av grunnene til dette kan være at gjeller er mer direkte utsatt for forurensning enn blodcellene på grunn av at gjeller hos muslinger og fisk er i direkte kontakt med omgivelsene (Arabi, 2004; Jorgensen, 1996). Fisk kan vandre over lengre avstander, imens mange bløtdyr (slik som muslinger) er stasjonære og vil dermed for det meste oppholde seg på det samme stedet. Dette kan påvirke graden av eksponering hos fisk og muslinger. Fisk kan for eksempel bli eksponert for flere miljøgifter fra flere områder eller bli eksponert i mindre grad hvis de migrerer til et område som ikke er like utsatt for miljøforurensning. Noe annet som kan ha en innvirkning på ulik DNA-skade i gjeller og hemocytter/erytrocytter er at det er enklere å forberede blodceller for comet assay enn det er å forberede vev siden blodcellene allerede er i suspensjon og kun må fortynnes, imens vevsprøvene må behandles på forhånd før analysen. For å kunne bruke comet assay må cellene være enkeltceller og vevsprøver må bearbeides kraftig før analysen, noe som er vist å kunne føre til DNA-skade (Frenzilli et al., 2009). Hvordan prøvene er opparbeidet kan også ha noe å si på mengden med DNA-skade som blir målt i analysen.

Det varierer hva slags miljøgifter som blir undersøkt. De miljøgiftene som har blitt undersøkt både i fisk og bløtdyr er kobber, kadmium og B[a]P. Der noen av studiene også har tatt for seg miljøgifter eller stressorer i kombinasjon med hverandre (se **Tabell 3**). Siden den totale effekten av miljøgifter i økosystemer kan være vanskelig å forutsi selv med gode studier gjort på de individuelle miljøgiftene, bør det i større grad gjøres studier som ser på ulike miljøgift-kombinasjoner, slik som Al-Shaeri et al. (2013) der effektene av SWCNTs sammen med ulike metaller ble undersøkt. I denne studien var det en synergistisk effekt hvor SWCNTs i kombinasjon med Cd og Zn estimerte en høyere DNA-skade enn i kombinasjon med kun en av metallene (se **Tabell 3**). Det som kan være problematisk i å undersøke effekten av en enkel miljøgift er at organismer i et økosystem som oftest blir påvirket av flere miljøgifter samtidig, og de kan interagere. Dette betyr at den totale effekten av to kjemikalier som gir DNA-skade kan være større eller mindre enn den effekten de ville hatt hver for seg.

Noen av studiene har studert fiskelinjer *in vitro*. Å ta i bruk fiskelinjer *in vitro* kan være fordelaktig siden de er enkle å bruke, de er kostnadseffektive, og de kan bidra med grenseløst materiale og tar høyde for etiske problemer i forbindelse med bruk av menneske-, eller dyrevev (Kaur & Dufour, 2012). Det som kan være en ulempe ved å bruke cellelinjer er at immortaliseringen av cellelinjene kan påvirke resultatet fra comet assay metoden siden cellene kan vokse nærmest uendelig og derfor oppføre seg annerledes enn celler *in vivo*. I en studie gjort med perifere mononukleære blodceller, THP-1 cellelinjer og Monocyttar eller hele blodceller, der isolerte blodceller var mer sensitive til stimulering med lipopolysakkarid til sammenligning med primærceller (Schildberger et al., 2013). De fysiologiske responsene til cellelinjer og primærceller er ikke identiske, siden cellelinjer er genetisk manipulert, noe som påvirker deres fenotype, opprinnelige funksjoner og responsen deres til stimuli (Kaur & Dufour, 2012). Relevante interaksjoner mellom målceller og de omliggende cellene kan være vanskelig å gjenskape Chanput et al., (2014), dette kan være en av grunnene til forskjeller i resultater mellom cellelinjer og primære celler. Å bruke cellelinjer i en kombinasjon med vanlige celler vil dermed være fordelaktig.

4.2 Lagring av prøver

De undersøkte studiene oppgir ikke hvor lang tid prøvene til comet assay har blitt lagret på is før analyse, og det virker som det er veldig lite fokus på om og hvordan lagring av prøver på is kan påvirke resultatene av analysen. De fleste analysene har skrevet at de har lagt prøvene på is eller at de har preparert cellene for comet assay direkte etter prøvetaking. Ventetiden mellom første og siste prøve antas å være neglisjerbar. Det kan antas at de ikke har tatt hensyn

til at noen av prøvene må ventes litt med siden en ikke kan se på alle prøvene og støpe dem samtidig. Dette kan være en feilkilde som ikke har blitt tatt i betraktning. I en studie gjort av Del Bo og kolleger med den Fpg-modifiserte comet assay var nivået av «FPG-sensitive sites» signifikant høyere i kryopreserverte celler sammenlignet med ferske celler der celler som var indusert med H₂O₂ var signifikant lavere etter lagring (Del Bo et al., 2015). Siden cellene i liten grad kan reparere seg selv når de ligger på is er det en potensiell fare for DNA-skade her også, noe som burde undersøkes ved en senere anledning. DNA er ganske robust og har utviklet mange mekanismer for å reparere seg selv og gjenopprette den genetiske informasjonen i DNA (Russev & Anachkova, 2009). På den andre siden er det mange studier som har viser til ingen signifikant forskjell mellom kryopreserverte celler og ferske celler (Bankoglu et al., 2021; Hininger et al., 2004; Kwok et al., 2013; Ladeira et al., 2019).

4.3 Lysering og elektroforese

I de undersøkte studiene varierer tiden for alkalisk utkveiling fra 15 min til 45 min (se Figur 4), dette vil ha en innvirkning på hvor stor DNA-skade som blir registrert via comet assay. Tiden for alkalisk utkveiling er en parameter som kan ha påvirkning på analysen (Collins et al., 2014). Azqueta og gruppen hennes har undersøkt hvordan ulike utkveilingstider og elektroforeseforhold kan påvirke graden av DNA-skade i to celletyper (blodlymfocytter og TK-6) (Azqueta et al., 2011a). Studien viste at «%Tail DNA» økte over tid i opptil 40 minutter i alkalisk utkveilingen både i H₂O₂-behandlede og i ubehandlede celler. Videre i studien kommer det fram at spenning er det som har mest å si på «%Tail DNA» der DNA-skaden øker med spenningen, men visuell scoring synes å være mindre sensitiv til spenningsforskjeller (Azqueta et al., 2011a). Selv om de fleste studiene har brukt samme spenning på 25 V har de ikke regnet ut spenningsgradienten (**Figur 3 og 5**). DNA er sterkt påvirket av elektroforesetid (opptil 40 min) og spenningsgradient mellom <0.2 og 1.6 V/cm (Collins et al., 2014). Selv om elektroforeseforholdene, og den alkaliske utkveilingstiden er den samme vil fortsatt inter-laboratorievariasjoner stå for den største delen av totalvariasjonen av resultatene til comet Assay (Collins et al., 2014), noe som antyder et større behov for mer standardisering av metoden.

4.4. Scoring

De cellene/vevene som har blitt undersøkt i studiene er gjeller, mantel, hemocytter, gjeller, nyre, sædceller og gonader. To studier har utført prøvetakningen samme år med samme arter, der begge har undersøkt hemocytter og gjeller (Fernandez-Tajes et al., 2011a; Pereira et al., 2011), resultatene fra studiene er ikke signifikant ulike (**Tabell 4**). I den ene studien Pereira et

al. (2011), har de gjennomført to prøvetakningsperioder, der det er små variasjoner i resultatene. Begge studiene har brukt samme elektroforesetid, spenning, strøm og alkalinitet, dette kan være med på å hindre forskjellene i resultatene og viser at metoden ikke har stor variabilitet.

I to studier som begge har undersøkt Cd, der den ene har studert erytrocytter i fisk og den andre har studert hemocytter i bløtdyr, er det en betydelig høyere DNA-skade i bløtdyr enn i fisk med henholdsvis 53.54% og 14.41% (**Tabell 3** og **8**). Grunnen til dette er nok hvilken konsentrasjon som artene har blitt eksponert for, der den høyeste konsentrasjonen som bløtdyret *N. chamaelon* har blitt utsatt for er 75 µg/L og fisken *Sparus aurata* ble utsatt for 0.1 mg/L (**Tabell 1** og **5**). For å kunne sammenligne på tvers av studier er det derfor viktig å ha samme design på studien.

I studiene har de fleste brukt «%Tail DNA» som parameter, men det er også noen studier som har brukt TM, TL og OTM. Dette kan gjøre det vanskelig å sammenligne resultatene fra scoring siden det har blitt brukt forskjellige parametere i ulike studier. De fleste studiene med bløtdyr har brukt «%Tail DNA», men det er også noe som har brukt TM og TL. TM i studiene som har undersøkt fisk er det flere studier som i tillegg til «%Tail DNA», TM og TL har brukt visuell scoring. I følge Collins er den mest brukbare parameteren for å måle DNA-trådbrudd i celler «%Tail DNA», fordi den har et linjert forhold til bruddfrekvensen og skade kan observeres over det bredeste mulige området (i teorien, 0 til 100%) (Collins, 2004).

Det er noen av studiene som har brukt visuell scoring til å estimere DNA-skade. Visuell scoring estimerer lavere DNA-skade høyere enn ved bildeanalyse scoring, men bildeanalyse kan estimere lavere med høyere skade på grunn av at kometene kan overlappe og da vil ikke programmet som scorer kometene telle disse cellene (Azqueta & Collins, 2013). Utenom dette er det tidligere vist at visuell scoring og bildeanalyse nesten gir samme resultat (Collins et al., 2008). Innenfor visuell scoring gir 5 klasser fra 0-4 best oppløsning. Her vil 0 være den laveste scoren og 400 være den høyeste scoren (Collins, 2004).

I en av studiene gjort på fisk har den siste klassen av kometer innenfor visuell scoring ikke blitt tatt med (klasse nummer tre) siden de har antatt at disse cellene er apoptotiske celler (Kammann et al., 2000). Andre studier som har sett bort ifra såkalte «hedgehogs» celler er (Dixon et al., 2004; Pruski & Dixon, 2003). «Hedgehogs» er celler der mesteparten av DNA-et ligger i halen på kometen (Meintieres et al., 2003). Argumentet for å utelate disse cellene er at de er apoptotiske, siden bilde av cellene med høyest DNA-skade forsvant, og at dette mest

sannsynlig var på grunn av tap av fluorescens i nedbrutt DNA (Kammann et al., 2000). Collins argumenterer for at comet assay ikke kan detektere apoptose av to grunner: Apoptose er irreversibelt, men «hedgehogs» kometer kan bli reparert slik at det ikke lenger er mulig å se «hedgehogs» (Collins, 2004). Den andre grunnen er at apoptose er karakterisert med fragmentering av DNA til størrelsen av nukleosomoligomerer. Dette er såpass små biter av DNA som ville ha forsvunnet under lysering eller elektroforese (Collins, 2004). En studie som har undersøkt tettheten av kometer i gelen og nedgangen i «%Tail DNA» i celler som ble inkubert etter behandling med H₂O₂ kom fram til at «hedgehogs» ikke er apoptotiske celler, men heller at grunnen til at de forsvinner er at DNA-et reparerer seg selv (Lorenzo et al., 2013). En annen studie har undersøkt celler i cellelinjen CTLL-2 der de kom fram til at «hedgehogs» eller «ghost cells» ikke er apoptotiske celler siden de forsvinner under elektroforesen (Meintieres et al., 2003). Det å utelate disse celletypene kan dermed ha en innvirkning på resultatet til analysen og burde derfor bli inkludert i resultatene siden de representerer enden av spekteret på DNA-skade (Lorenzo et al., 2013).

4.5 Comet assay sammenlignet med andre metoder som brukes for å undersøke DNA-skade i celler

Fordelen med å bruke comet assay er at gentoksisteten er detektert på enkeltcellenivå, de fleste eukaryote celler kan brukes i analysen, kun et lite utvalg av celler er nødvendig, metoden er raskere, mer sensitiv enn andre tilgjengelige metoder for å analysere DNA-trådbrudd (Frenzilli et al., 2009). Ulempene med metoden er at det er enkeltcelldata, begrenset utvalg av celler, tekniske variasjoner og tolkning (Jiang et al., 2023).

Enkeltcelldata sier lite om hvordan DNA-skaden påvirker mekanismene til cellene, men enkeltcelldata er lettere å kvantifisere. Metoden kan også kun evaluere direkte DNA skade eller «alkali labile spots», lesjons-spesifikke enzymer må bli brukt for å kunne identifisere lesjoner nøyaktig og spesifikt (Jiang et al., 2023).

En annen mye brukt metode for å se på DNA-skade er “Micronucleus assay” (MNA) som blir brukt til å undersøke genetisk skade i mitotiske celler (Araldi et al., 2015). Fordelene med å ta i bruk MNA er at den gir nøyaktige data som er enkle og detektere endepunktene på (Hayashi, 2016). Analysen blir ofte brukt i kombinasjon med comet assay (Araldi et al., 2015), også i mange av studiene som har blitt gjennomgått i denne litteraturstudien (Siu et al., 2004; Amado et al., 2006a; Amado et al., 2006b; Krishnakumar et al., 2006; Katsumiti et al., 2009; Fasulo et al., 2010; Srut et al., 2010; Negreiros et al., 2011; Shirani et al., 2012; Della Torre et al., 2013; Stambuk et al., 2013; Burgeot et al., 2017; Lima et al., 2019). Noen av fordelene med MNA

over comet assay er at den kun tar i betraktning genetisk skade i mitotiske celler der comet assay detekterer skade både i interfase og i mitotiske celler (Miller et al., 1998). Det å bruke begge analysene i kombinasjon med hverandre kan være nyttig for å få et best mulig resultat for å undersøke ulike typer DNA-skade.

Andre analyser som kan bli brukt til å detektere DNA-skade ved å estimere graden av oksiderte baser i DNA er «High performance liquid chromatography» (HPLC), men denne metoden har vist seg å overestimere graden av DNA-skade (Gedik et al., 1998) og synes derfor mindre nyttig enn comet assay og MNA.

4.6 Usikkerheter knyttet til oppgaven

Noen av begrensingene med å bruke søkemotorer er at en ikke kan være helt sikkert på at alle søkeordene er optimale eller om det er noen eldre studier som har brukt andre MeSH-termer som ikke har blitt med i utvalget. Det å ta i bruk flere søkemotorer for å sammenligne resultatene som kommer opp innenfor hver søkemotor kunne ha gjort at utvalget av studier hadde vært bedre. I de fleste studiene har resultatene blitt tolket fra grafer noe som kan ha ført til upresis lesing av resultater.

Data som kjønn og alder på artene har ikke blitt samlet inn, dette kan også påvirke resultatene fra scoring. I en studie med rotter var det tydelige kjønnsforskjeller i akutt giftighet til legemiddelet Amphotericin B (AmB) der hunnene hadde høyere dødelighet enn hannene (Wang et al., 2021). Dette vil også kunne påvirke resultatene i fisk og bløtdyr.

4.7 Fremtidige studier

Noe som ikke er undersøkt i denne oppgaven som kan være interessant å studere videre er hvordan prosesseringen av vev, agarosekonsentrasjonen og kjønn kan påvirke resultatet. På grunn av liten dokumentasjon hvor lenge prøver lagres på is før støpning er dette også noe som burde undersøkes nærmere. Siden interlaboratorievariasjoner synes å utgjøre en stor andel av observerte variasjoner i metoden, kan det i fremtiden være interessant å utforske dette bedre slik at en standardisert protokoll kan fastsettes for fisk og bløtdyr. Ulike laboratorier bør motta samme prøver/ gjøre samme eksperiment med samme cellelinje/celler og behandle dem likt før det undersøkes om det er noen variasjon. Parallelt bør de samme prøvene vurderes av de ulike laboratoriene med deres egen protokoll slik at resultatet kan sammenlignes.

5 Konklusjon

I denne litteraturstudien har det blitt undersøkt hvilke metodevariasjoner som finnes i studier som har brukt comet assay til kvantifisering av DNA-skade i bløtdyr og fisk, og hvordan dette kan påvirke resultatene fra metoden. De fire ulike kategoriene design og prøvetakning, lagring av prøver, lysering og elektroforese, og scoring har blitt undersøkt.

Forskjeller i artsensitivitet mellom ulike rekker og mellom ulike celler og vev kan ha en påvirkning på resultatet for eksempel i sammenligning med hemocytter og gjeller der gjeller er mer sensitive for DNA-skade.

Bruk av fiskelinjer *in vitro* er enkle å bruke, de er kostnadseffektive og kan bidra med grenseløst materiale. I tillegg eliminerer det etiske problemer i forbindelse med bruk av menneske- eller dyrevev. utfordringene med å bruke fiskelinjer er at immortaliseringen av cellelinjene kan påvirke resultatet fra comet assay siden cellene kan vokse nærmest uendelig og derfor oppføre seg annerledes enn celler *in vivo*. Å bruke cellelinjer i en kombinasjon med vanlige celler vil dermed kunne være fordelaktig.

Ingen av de undersøkte studiene har oppgitt hvor lang tid de har lagret prøvene sine på is/kjølig. Det bør undersøkes bedre hvordan dette kan påvirke grad av DNA-skade gjennom til dels enkle eksperimenter. Tiden i alkalisk utkveiling varierer i stor grad og er en av parametrene som kan ha innvirkning på resultatene. Spenningsgrad blir også oppgitt svært sjeldent, og dette anbefales gjort for hver enkelt studie for bedre sammenligningsgrunnlag av resultater og bedre reproduktivitet.

Variasjonen av parametre som har blitt brukt i scoring gjør det vanskelig å sammenligne resultater på tvers av studier, derfor kan det være lurt å oppgi flere parametre i studier gjort med comet assay. Det er noen studier som ikke har regnet med «hedgehogs» i sine resultater. Det å utelate «hedgehogs» fra resultatene kan ha en innvirkning på resultatet til analysen siden de representerer enden av spekteret på DNA-skade. I fremtidige studier vil det å undersøke hvordan prosesseringen av vev, agarosekonsentrasjonen og større grad av dokumentasjon rundt lagring av prøver på is/kjølig ved interlaboratoriestudier.

Ulik vektlegging av scoring-parametre gjør sammenligning av resultater på tvers av studier vanskeligere, og disse bør derfor oppgis. I noen studier er visse deler av resultatene, slik som "hedgehogs" utelatt, men grunnlaget for dette er noe usikkert. «Hedgehogs» representerer enden av spekteret for DNA-skade, og ved å utelate dem vil det kunne introduseres en viss

skjevhet i resultatene, noe som igjen gjør sammenligning vanskeligere. Alt i alt bør det stilles større krav til dokumentasjon av alle vurderingsparametere i comet assay, og det anbefales for fremtidige studier å undersøke hvordan agarosekonsentrasjon, prøveopparbeiding og særlig vevsprosessering, samt både korttids- og langtids-lagring av prøver påvirker resultatene i comet assay.

6 Litteraturliste

- Afanasieva, K., & Sivolob, A. (2018). Physical principles and new applications of comet assay. *Biophysical Chemistry*, 238, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.003>
- Akcha, F., Tanguy, A., Leday, G., Pelluhet, L., Budzinski, H., & Chiffolleau, J. F. (2004). Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Marine Environmental Research*, 58(2-5), 753-756. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.090>
- Al-Shaeri, M., Ahmed, D., McCluskey, F., Turner, G., Paterson, L., Dyrinda, E. A., & Hartl, M. G. J. (2013). Potentiating Toxicological Interaction of Single-Walled Carbon Nanotubes with Dissolved Metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(12), 2701-2710. <https://doi.org/10.1002/etc.2365>
- Al-Subiai, S. N., Moody, A. J., Mustafa, S. A., & Jha, A. N. (2011). A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7), 1913-1920. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.012>
- Alnajar, N., Jha, A. N., & Turner, A. (2021). Impacts of microplastic fibres on the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 262, 128290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128290>
- Amado, L. L., da Rosa, C. E., Leite, A. M., Moraes, L., Pires, W. V., Pinho, G. L., Martins, C. M., Robaldo, R. B., Nery, L. E., Monserrat, J. M., Bianchini, A., Martinez, P. E., & Geracitano, L. A. (2006a). Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, 52(2), 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.11.006>
- Amado, L. L., Robaldo, R. B., Geracitano, L., Monserrat, J. M., & Bianchini, A. (2006b). Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 52(2), 207-213. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.11.007>
- Arabi, M. (2004). Analyses of impact of metal ion contamination on carp (*Cyprinus carpio* L.) gill cell suspensions. *Biological Trace Element Research*, 100(3), 229-245. <https://doi.org/10.1385/Bter:100:3:229>
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sa Junior, P. L., Nozima, B. H., Ito, E. T., de Carvalho, R. F., de Souza, E. B., & de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>

- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949-968.
<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., & Collins, A. R. (2011a). Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 724(1-2), 41-45.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.010>
- Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., Sallette, J., Soussaline, F., & Collins, A. (2011b). The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. *Mutagenesis*, 26(3), 393-399. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq105>
- Bankoglu, E. E., Stipp, F., Gerber, J., Seyfried, F., Heidland, A., Bahner, U., & Stopper, H. (2021). Effect of cryopreservation on DNA damage and DNA repair activity in human blood samples in the comet assay. *Archives of Toxicology*, 95(5), 1831-1841. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03012-4>
- Barreto, A., Luis, L. G., Pinto, E., Almeida, A., Paíga, P., Santos, L., Delerue-Matos, C., Trindade, T., Soares, A., Hylland, K., Loureiro, S., & Oliveira, M. (2019). Genotoxicity of gold nanoparticles in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) after single exposure and combined with the pharmaceutical gemfibrozil. *Chemosphere*, 220, 11-19.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.090>
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Brate, I. L. N., & Schoyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research*, 130, 338-365.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>
- Brooks, S., Lyons, B., Goodsir, F., Bignell, J., & Thain, J. (2009). Biomarker Responses in Mussels, an Integrated Approach to Biological Effects Measurements. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 72(3-4), 196-208. <https://doi.org/Pii> 908403958
10.1080/15287390802539038
- Brunborg, G., Eide, D. M., Graupner, A., Gutzkow, K., Shaposhnikov, S., Kruszewski, M., Sirota, N., Jones, G. D. D., Koppen, G., Vanhavere, F., Moller, P., Stetina, R., Dahl, H., & Collins, A. (2023). Calibration of the comet assay using ionising radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 885, 503560.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503560>
- Burgeot, T., Akcha, F., Ménard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Martínez-Gómez, C., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., Minier, C., Broeg, K., & Hylland, K. (2017). Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards

- applying biological effects to monitoring. *Marine Environmental Research*, 124, 92-105.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.10.009>
- Chang, T., & Zhao, G. (2021). Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Advanced Science*, 8(6), 2002425. <https://doi.org/10.1002/advs.202002425>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37-45.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E. E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, E., Brunborg, G., Chao, C., Cooke, M. S., Costa, C., Costa, S., Dhawan, A., De Lapuente, J., Bo', C. D., Dubus, J., Dusinska, M., . . . Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- Collins, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249-261. <https://doi.org/10.1385/mb:26:3:249>
- Collins, A. R., El Yamani, N., Lorenzo, Y., Shaposhnikov, S., Brunborg, G., & Azqueta, A. (2014). Controlling variation in the comet assay. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/ARTN> 359
 10.3389/fgene.2014.00359
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., & Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
- Dallas, L. J., Cheung, V. V., Fisher, A. S., & Jha, A. N. (2013). Relative sensitivity of two marine bivalves for detection of genotoxic and cytotoxic effects: a field assessment in the Tamar Estuary, South West England. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 3397-3412.
<https://doi.org/10.1007/s10661-012-2800-0>
- Del Bo, C., Fracassetti, D., Lanti, C., Porrini, M., & Riso, P. (2015). Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention. *Mutagenesis*, 30(1), 29-35.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geu058>
- Della Torre, C., Petochi, T., Corsi, I., Dinardo, M. M., Baroni, D., Alcaro, L., Focardi, S., Tursi, A., Marino, G., Frigeri, A., & Amato, E. (2010). DNA damage, severe organ lesions and high muscle levels of As and Hg in two benthic fish species from a chemical warfare agent dumping site in the Mediterranean Sea. *Science of the Total Environment*, 408(9), 2136-2145.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.001>
- Della Torre, C., Petochi, T., Farchi, C., Corsi, I., Dinardo, M. M., Sammarini, V., Alcaro, L., Mechelli, L., Focardi, S., Tursi, A., Marino, G., & Amato, E. (2013). Environmental hazard of yperite

released at sea: sublethal toxic effects on fish. *J Hazard Mater*, 248-249, 246-253.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.003>

Depledge, M. H., Aagaard, A., & Györkös, P. (1995). Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 31(1-3), 19-27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00006-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00006-9)

Dixon, D. R., Pruski, A. M., & Dixon, L. R. J. (2004). The effects of hydrostatic pressure change on DNA integrity in the hydrothermal-vent mussel *Bathymodiolus azoricus*: implications for future deep-sea mutagenicity studies. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1-2), 235-246.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.026>

Dupuy, C., Galland, C., Devaux, A., Bony, S., Loizeau, V., Danion, M., Pichereau, V., Fournier, M., & Laroche, J. (2014). Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), 13789-13803. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2563-y>

Emmanouil, C., & Chipman, J. K. (2008). Excision of an oxidative DNA lesion (8-oxo-deoxyguanosine) in *Mytilus edulis* populations from two sites in the eastern Irish Sea. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 43(14), 1586-1591. <https://doi.org/Pii> 905094414

10.1080/10934520802329802

Ersson, C., Moller, P., Forchhammer, L., Loft, S., Azqueta, A., Godschalk, R. W. L., van Schooten, F. J., Jones, G. D. D., Higgins, J. A., Cooke, M. S., Mistry, V., Karbaschi, M., Phillips, D. H., Sozeri, O., Routledge, M. N., Nelson-Smith, K., Riso, P., Porrini, M., Matullo, G., . . . Moller, L. (2013). An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis*, 28(3), 279-286. <https://doi.org/10.1093/mutage/get001>

Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Cachot, J., Charrier, G., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 676-689. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1138-z>

Fasulo, S., Marino, S., Mauceri, A., Maisano, M., Giannetto, A., D'Agata, A., Parrino, V., Minutoli, R., & De Domenico, E. (2010). A multibiomarker approach in *Coris julis* living in a natural environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1565-1573.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.008>

Fernandez-Tajes, J., Florez, F., Pereira, S., Rabade, T., Laffon, B., & Mendez, J. (2011a). Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 177(1-4), 289-300. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1634-x>

- Fernandez-Tajes, J., Rabade, T., Laffon, B., & Mendez, J. (2011b). Monitoring Follow up of Two Areas Affected by the Prestige Oil Four Years after the Spillage. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 74(15-16), 1067-1075.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2011.582312>
- Forbes, V. E., & Calow, P. (2002). Species Sensitivity Distributions Revisited: A Critical Appraisal. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8(3), 473-492.
<https://doi.org/10.1080/10807030290879781>
- Forbes, V. E., Palmqvist, A., & Bach, L. (2006). THE USE AND MISUSE OF BIOMARKERS IN ECOTOXICOLOGY. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1), 272.
<https://doi.org/10.1897/05-257r.1>
- Forchhammer, L., Johansson, C., Loft, S., Moller, L., Godschalk, R. W. L., Langie, S. A. S., Jones, G. D. D., Kwok, R. W. L., Collins, A. R., Azqueta, A., Phillips, D. H., Sozeri, O., Stepnik, M., Palus, J., Vogel, U., Wallin, H., Routledge, M. N., Handforth, C., Allione, A., . . . Moller, P. (2010). Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*, 25(2), 113-123.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gep048>
- Frenzilli, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, M., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., & Regoli, F. (2004). Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Marine Environmental Research*, 58(2-5), 609-613. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.050>
- Frenzilli, G., Nigro, M., & Lyons, B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 681(1), 80-92. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>
- Frotschl, R. (2015). Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. *Mutagenesis*, 30(1), 51-57. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu069>
- Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., Pourrut, B., Del Bo', C., Novak, M., Sramkova, M., Milić, M., Gutzkow, K. B., Costa, S., Dusinska, M., Brunborg, G., & Collins, A. (2019a). The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 779, 82-113.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.003>
- Gedik, C. M., Wood, S. G., & Collins, A. R. (1998). Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the comet assay compared. *Free Radical Research*, 29(6), 609-615.
<https://doi.org/10.1080/10715769800300661>
- Halldorsson, H. P., Ericson, G., & Svavarsson, J. (2004). DNA strand breakage in mussels (*Mytilus edulis* L.) deployed in intertidal and subtidal zone in Reykjavik harbour. *Marine Environmental Research*, 58(2-5), 763-767. <https://doi.org/DOI>
10.1016/j.marenvres.2004.03.092

- Hartl, M. G. J., Kilemade, M., Coughlan, B. M., O'Halloran, J., van Pelt, F. N. A. M., Sheehan, D., Mothersill, C., & O'Brien, N. M. (2006). A two-species biomarker model for the assessment of sediment toxicity in the marine and estuarine environment using the comet assay. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 41(5), 939-953. <https://doi.org/10.1080/10934520600614629>
- Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. *Genes and Environment*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>
- Hininger, I., Chollat-Namy, A., Sauvaigo, S., Osman, M., Faure, H., Cadet, J., Favier, A., & Roussel, A. M. (2004). Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutation Research*, 558(1-2), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.11.004>
- Hylland, K., Skei, B. B., Brunborg, G., Lang, T., Gubbins, M. J., Le Goff, J., & Burgeot, T. (2017). DNA damage in dab (*Limanda limanda*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) from European seas. *Marine Environmental Research*, 124, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.01.001>
- Isani, G., Andreani, G., Cocchioni, F., Fedeli, D., Carpené, E., & Falcioni, G. (2009). Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.015>
- Jorgensen, C. B. (1996). Bivalve filter feeding revisited. *Marine Ecology Progress Series*, 142(1-3), 287-302. [https://doi.org/DOI 10.3354/meps142287](https://doi.org/DOI%2010.3354/meps142287)
- Júnior, E. O. D. C., Pereira, B. B., & Morelli, S. (2015). Monitoring Genotoxicity Potential in the Mumbuca Stream, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(20), 1277-1287. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1082524>
- Kacar, A., Pazi, I., Gonul, T., & Kucuksezgin, F. (2016). Marine pollution risk in a coastal city: use of an eco-genotoxic tool as a stress indicator in mussels from the Eastern Aegean Sea. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(16), 16067-16078. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6783-1>
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., & Wosniok, W. (2004). Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental Pollution*, 132(2), 279-287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.021>
- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., & Theobald, N. (2001). A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, 498(1-2), 67-77. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00268-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00268-6)

- Kammann, U., Riggers, J. C., Theobald, N., & Steinhart, H. (2000). Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutation Research*, 467(2), 161-168.
[https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(00\)00030-9](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00030-9)
- Katsumiti, A., Domingos, F. X., Azevedo, M., da Silva, M. D., Damian, R. C., Almeida, M. I., de Assis, H. C., Cestari, M. M., Randi, M. A., Ribeiro, C. A., & Freire, C. A. (2009). An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 152(1-4), 209-222. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0309-3>
- Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines. *Spermatogenesis*, 2(1), 1-5.
<https://doi.org/10.4161/spmg.19885>
- Kilemade, M. F., Hartl, M. G., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F. N., O'Halloran, J., & O'Brien, N. M. (2004). Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 44(1), 56-64. <https://doi.org/10.1002/em.20028>
- Krishnakumar, P. K., Sasikumar, G., Bhat, G. S., & Asokan, D. P. K. (2006). Biomarkers of environmental contaminants in field population of green mussel (*Perna viridis*) from Karnataka-Kerala coast (South West coast of India). *Ecotoxicology*, 15(4), 347-352.
<https://doi.org/10.1007/s10646-006-0071-7>
- Kwok, A., Lyons, B. P., Hodges, N. J., & Bean, T. P. (2013). Cryopreservation and storage of mussel (*Mytilus* spp.) haemocytes for latent analysis by the Comet assay. *Mutation Research*, 750(1-2), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.09.010>
- Ladeira, C., Koppen, G., Scavone, F., & Giovannelli, L. (2019). The comet assay for human biomonitoring: Effect of cryopreservation on DNA damage in different blood cell preparations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.02.002>
- Laffon, B., Rabade, T., Pasaro, E., & Mendez, J. (2006). Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environment International*, 32(3), 342-348.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.002>
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., Cachot, J., Chérel, Y., Larcher, T., Riso, R., Pichereau, V., Devier, M. H., & Budzinski, H. (2013). Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 738-748. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1276-3>
- Lewis, C., & Galloway, T. (2009). Reproductive Consequences of Paternal Genotoxin Exposure in Marine Invertebrates. *Environmental Science & Technology*, 43(3), 928-933.
<https://doi.org/10.1021/es802215d>

- Lima, A. R. B., Torres, R. A., Jacobina, U. P., Pinheiro, M. A. A., & Adam, M. L. (2019). Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.037>
- Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A. R., & Azqueta, A. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, 28(4), 427-432. <https://doi.org/10.1093/mutage/get018>
- Mamaca, E., Bechmann, R. K., Torggrimsen, S., Aas, E., Bjørnstad, A., Baussant, T., & Floch, S. L. (2005). The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 191-201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.001>
- Martins, M., Costa, P. M., Raimundo, J., Vale, C., Ferreira, A. M., & Costa, M. H. (2012). Impact of remobilized contaminants in *Mytilus edulis* during dredging operations in a harbour area: Bioaccumulation and biomarker responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 85, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.008>
- Meintieres, S., Nesslany, F., Pallardy, M., & Marzin, D. (2003). Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41(4), 260-269. <https://doi.org/10.1002/em.10156>
- Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D., & Madle, S. (1998). Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung. *Mutation Research*, 410(1), 81-116. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(97\)00030-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(97)00030-6)
- Moller, P. (2018). The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*, 33(1), 1-7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>
- Moller, P., Loft, S., Ersson, C., Koppen, G., Dusinska, M., & Collins, A. (2014). On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Frontiers in Genetics*, 5, 217. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00217>
- Muruzabal, D., Collins, A., & Azqueta, A. (2021). The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology*, 147. <https://doi.org/ARTN111865>
10.1016/j.fct.2020.111865
- Møller, P., Muruzabal, D., Bakuradze, T., Richling, E., Bankoglu, E. E., Stopper, H., Langie, S. A. S., Azqueta, A., Jensen, A., Scavone, F., Giovannelli, L., Wojewódzka, M., Kruszewski, M., Valdiglesias, V., Laffon, B., Costa, C., Costa, S., Teixeira, J. P., Marino, M., . . . Collins, A. (2020). Potassium bromate as positive assay control for the Fpg-modified comet assay. *Mutagenesis*, 35(4), 341-348. <https://doi.org/10.1093/mutage/geaa011>

- Negreiros, L. A., Silva, B. F., Paulino, M. G., Fernandes, M. N., & Chippari-Gomes, A. R. (2011). Effects of hypoxia and petroleum on the genotoxic and morphological parameters of *Hippocampus reidi*. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(4), 408-414. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.001>
- NIVA. (2019). *Contaminants in coastal waters of Norway 2019* (REPORT SNO. 7741-2022). <https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/2997095>
- Nyman, A. M., Schirmer, K., & Ashauer, R. (2014). Importance of toxicokinetics for interspecies variation in sensitivity to chemicals. *Environmental Science & Technology*, 48(10), 5946-5954. <https://doi.org/10.1021/es5005126>
- OECD. (2016). Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. <https://www.oecd.org/env/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay-9789264264885-en.htm>
- Olive, P. L. (2002). The Comet Assay: An Overview of Techniques. In (pp. 179-194). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:179>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- Olive, P. L., Banath, J. P., & Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research*, 122(1), 86-94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2320728>
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian-Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298. [https://doi.org/Doi 10.1016/0006-291x\(84\)90411-X](https://doi.org/Doi 10.1016/0006-291x(84)90411-X)
- Pavlaki, M. D., Araújo, M. J., Cardoso, D. N., Silva, A. R. R., Cruz, A., Mendo, S., Soares, A., Calado, R., & Loureiro, S. (2016). Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. *Environmental Pollution*, 215, 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.010>
- Pereira, S. M., Fernandez-Tajes, J., Rabade, T., Florez-Barros, F., Laffon, B., & Mendez, J. (2011). Comparison between Two Bivalve Species as Tools for the Assessment of Pollution Levels in an Estuarine Environment. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 74(15-16), 1020-1029. <https://doi.org/10.1080/15287394.2011.582271>
- Pruski, A. M., & Dixon, D. R. (2003). Toxic vents and DNA damage: first evidence from a naturally contaminated deep-sea environment. *Aquatic Toxicology*, 64(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/S0166-445x\(03\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445x(03)00010-9)
- Pruski, A. M., & Dixon, D. R. (2007). Heat shock protein expression pattern (HSP70) in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research*, 64(2), 209-224. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.01.003>

- Raimundo, J., Costa, P. M., Vale, C., Costa, M. H., & Moura, I. (2010). DNA damage and metal accumulation in four tissues of feral *Octopus vulgaris* from two coastal areas in Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1543-1547. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.034>
- Rank, J., Lehtonen, K. K., Strand, J., & Laursen, M. (2007). DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*, 84(1), 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.05.013>
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., & Nigro, M. (2004). Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.011>
- Rubach, M. N., Ashauer, R., Maund, S. J., Baird, D. J., & Van den Brink, P. J. (2010). Toxicokinetic variation in 15 freshwater arthropod species exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(10), 2225-2234. <https://doi.org/10.1002/etc.273>
- Russev, G., & Anachkova, B. (2009). Measuring DNA Repair. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(2), 1162-1169. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817632>
- Rydberg, B., & Johansen, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-322650-1.50090-4>
- Sahlmann, A., Wolf, R., Holth, T. F., Titelman, J., & Hylland, K. (2017). Baseline and oxidative DNA damage in marine invertebrates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(16-18), 807-819. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1352179>
- Sarkar, A., Bhagat, J., Ingole, B. S., Rao, D. P., & Markad, V. L. (2015). Genotoxicity of Cadmium Chloride in the Marine Gastropod *Nerita chamaeleon* Using Comet Assay and Alkaline Unwinding Assay. *Environmental Toxicology*, 30(2), 177-187. <https://doi.org/10.1002/tox.21883>
- Schildberger, A., Rossmannith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., & Weber, V. (2013). Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators of Inflammation*, 2013, 697972. <https://doi.org/10.1155/2013/697972>
- Shailaja, M. S., Rajamanickam, R., & Wahidulla, S. (2006). Formation of genotoxic nitro-PAH compounds in fish exposed to ambient nitrite and PAH. *Toxicology Science*, 91(2), 440-447. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj151>
- Shaw, J. P., Large, A. T., Donkin, P., Evans, S. V., Staff, F. J., Livingstone, D. R., Chipman, J. K., & Peters, L. D. (2004). Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 67(4), 325-336. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.013>

- Shirani, M., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., & Abdollahi, M. (2012). Biomarker responses in mudskipper (*Periophthalmus waltoni*) from the coastal areas of the Persian Gulf with oil pollution. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 705-713. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.018>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Singh, R., & Hartl, M. G. (2012). Fluctuating estuarine conditions are not confounding factors for the Comet assay assessment of DNA damage in the mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology*, 21(7), 1998-2003. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0934-z>
- Siu, W. H. L., Cao, J., Jack, R. W., Wu, R. S. S., Richardson, B. J., Xu, L., & Lam, P. K. S. (2004). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66(4), 381-392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.006>
- Spurgeon, D., Lahive, E., Robinson, A., Short, S., & Kille, P. (2020). Species Sensitivity to Toxic Substances: Evolution, Ecology and Applications [Review]. *Frontiers in Environmental Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.588380>
- Srut, M., Stambuk, A., Pavlica, M., & Klobucar, G. I. (2010). Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for in situ assessment of pollution-related genotoxicity. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 61(1), 29-36. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1988>
- Šrut, M., Traven, L., Štambuk, A., Kralj, S., Žaja, R., Mićović, V., & Klobučar, G. I. (2011). Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.015>
- Stambuk, A., Suta, M., Satovic, Z., Tkalec, M., & Klobucar, G. I. V. (2013). Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic. *Aquatic Toxicology*, 136, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.017>
- Thomas, R. E., Lindeberg, M., Harris, P. M., & Rice, S. D. (2007). Induction of DNA strand breaks in the mussel (*Mytilus trossulus*) and clam (*Protothaca staminea*) following chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the Exxon Valdez spill. *Marine Pollution Bulletin*, 54(6), 726-732. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.01.009>
- Tran, D., Moody, A. J., Fisher, A. S., Foulkes, M. E., & Jha, A. N. (2007). Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquatic Toxicology*, 84(1), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.05.009>
- Urbina, M. A., Cumillaf, J. P., Paschke, K., & Gebauer, P. (2019). Effects of pharmaceuticals used to treat salmon lice on non-target species: Evidence from a systematic review. *Science of the Total Environment*, 649, 1124-1136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.334>

- Wang, D., Zhang, W., Ju, J. X., Wang, L. J., Huang, R. Y., Xu, Y. F., Zhang, H. L., & Qi, J. L. (2021). Gender differences in acute toxicity, toxicokinetic and tissue distribution of amphotericin B liposomes in rats. *Toxicology Letters*, 338, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.12.004>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan J., Chang, W., McGowan, LD, F., R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Heston, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller K, Ooms J, Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., . . . Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, R. W. S., Galbán-Malagón, C., Adell, A. D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R. A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Luarte, T., . . . Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>
- Yang, F., Zhang, Q., Guo, H., & Zhang, S. (2010). Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. *Toxicology in Vitro*, 24(7), 2003-2011. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.019>
- Žegura, B., & Filipič, M. (2004). Application of In Vitro Comet Assay for Genotoxicity Testing. In (pp. 301-313). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-800-5:301>

7 Appendiks

Vedlegg A. Elektroforeseforhold.

Tabell 1: Oversikt over tid for utkveiling, spenning, elektroforesetid og strøm i bløtdyr.

Art:	Tid for alkalisk utkveiling (min):	Spennings (V):	Tid for elektroforese (min):	Strøm (mA):	Referanse:
Bathymodiolus azoricus	10	25	10	300	(Pruski & Dixon, 2003)
	-	-	-	-	(Pruski & Dixon, 2007)
	10	25	10	300	(Dixon et al., 2004)
Cerastoderma edule	20	25 (0.83 V/cm)	20	300	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)
	20	15	30	320	(Dallas et al., 2013)
	20	25 (0.83 V/cm)	20	300	(Pereira et al., 2011)
Mytilus edulis	15	25	5	300	(Rank et al., 2007)
	20	20	30	300	(Mamaca et al., 2005)
	20	25	30	300	(Al-Subiai et al., 2011)
	10	25	10	300	(Pruski & Dixon, 2003)
	20	25	10	300	(Shaw et al., 2004)
	30	25	25	300	(Al-Shaeri et al., 2013)
	20	25	30	300	(Tran et al., 2007)
	20	20	20	300	(Halldorsson et al., 2004)
	30	25 V/cm	25	300	(Singh & Hartl, 2012)
	30	30	20	300	(Emmanouil & Chipman, 2008)
	40	5	30	-	(Martins et al., 2012)
	20	15	25	-	(Sahlmann et al., 2017)
	45	25	30	300	(Lewis & Galloway, 2009)
Mytilus galloprovincialis	20	25	30	300	(Alnajjar et al., 2021)
	20	25 (0.83 V/cm)	20	300	(Laffon et al., 2006)
		25	25	300	(Kacar et al., 2016)
	20	25 (0.83 V/cm)	20	300	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)
	20	25 (0.83 V/cm)	20	300	(Pereira et al., 2011)
	10	25	5	300	(Regoli et al., 2004)
	20	25 (0.83 V/cm)	5	300	(Fernandez-Tajes et al., 2011b)
	10	25	5	300	(Frenzilli et al., 2004)
	15	35 (1.16 V/cm)	15	300	(Stambuk et al., 2013)
Mytilus trossulus	20	21	20	300	(Thomas et al., 2007)

Mytilus sp.	15	23 (0.66 V/cm)	20	390	(Akcha et al., 2004)
Nerita chamaeleon	15	20 (cc.1 V/cm)	-	300	(Sarkar et al., 2015)
Octopus vulgaris	40	25	30	-	(Raimundo et al., 2010)
Perna viridis	45	1 V/cm	30	300	(Siu et al., 2004)
	20	25	15	300	(Krishnakumar et al., 2006)
Protothaca staminea	20	21	20	300	(Thomas et al., 2007)
Tapes semidecussatus	30	25	25	300	(Hartl et al., 2006)
Venerupis pullastra	20	25 (0.83 V/cm)	20	300	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)

Tabell 2: Oversikt over tid for utkveiling, spenning, elektroforesetid og strøm i fisk.

Tid for alkalisk utkveiling (min)	Spenning (V):	Tid for elektroforese (min):	Strøm (mA):	pH på elektroforesebuffer:	Referanse:
20	25	15	300	13	(Kammann et al. 2004)
20	25	20	NA	13	(Kammann et al. 2000)
20	25	15	300	>13	(Kammann et al. 2000)
30	25 (0.96 V/cm)	25	300	13	(Kilemade et al., 2004)
20	20	15	300	NA	(Mamaca et al., 2005)
15	25	20	300	mellom 12 og 13	(Amado et al., 2006a)
15	25	20	300	mellom 12 og 13	(Amado et al., 2006b)
20	25	30	300	alkaline forhold	(Shailaja et al., 2006)
20	25	20	NA	>13	(Isani et al., 2009)
25	25	25	300	>13	(Katsumiti et al., 2009)
20	25	20	300	13..5	(Della Torre et al., 2010)
20	20	20	240	>13	(Fasulo et al., 2010)
20	25 V (0.83 V/cm)	20	300	>13	(Srut et al., 2010)
1.2 t	22	30	140	>13	(Yang et al., 2010)
20	25	15	300	13 eller høyere	(Negreiros, 2011)

20	25 (0.83 V/cm)	20	300	>13	(Srut et al., 2011)
30	25 (0.96 V/cm)	25	300	13	(Shirani et al., 2012)
20	25	20	NA	NA	(Della Torre et al., 2013)
40	20	24	300	>13	(Evrard et al., 2013)
40	20 (0.6 V/cm)	24	300	>13	(Laroche et al., 2013)
40	20 (0.6 V/cm)	24	300	>13	(Dupuy et al., 2014)
plusminus20	25 (0.7 V/cm)	15	300	>13	(Marques et al., 2014)
15	43	10	300	10	(Pavlaki et al., 2016)
20	25	20	310	NA	(Boehler et al., 2017)
15	23 (0.66 V/cm)	20	390	13	(Burgeot et al., 2017)
5+35	20	20 eller 30	300	>13.2	(Hylland et al., 2017)
20	15	25			(Sahlmann et al., 2017)
10	20 (0.83 V/cm)	30	300	>13	(Barreto et al., 2019)
20	25	25	300	NA	(Lima et al., 2019)

Vedlegg B. Lysisforhold.

Tabell 3: pH og tid i lysis i bløtdyr.

Art:	pH:	Tid:	Referanse:
Bathymodiolus azoricus	10	Over natten	(Pruski & Dixon, 2003)
	-	-	(Pruski & Dixon, 2007)
	10	Over natten	(Dixon et al., 2004)
Cerastoderma edule	10	1 t	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)
	10	1 t	(Dallas et al., 2013)
	-	-	(Pereira et al., 2011)
Mytilus edulis	10	1 t	(Rank et al., 2007)
	10	1 t	(Mamaca et al., 2005)
	10	1 t	(Al-Subiai et al., 2011)
	10	Over natten	(Pruski & Dixon, 2003)
	10	>1 t	(Shaw et al., 2004)
	10	90 min	(Al-Shaeri et al., 2013)
	10	1 t	(Tran et al., 2007)

	-	1 t	(Halldorsson et al., 2004)
	-	90 min	(Singh & Hartl, 2012)
	-	1 t	(Emmanouil & Chipman, 2008)
	-	1 t	(Martins et al., 2012)
	10	4 uker	(Sahlmann et al., 2017)
	-	1 t	(Lewis & Galloway, 2009)
	10	1 t	(Dallas et al., 2013)
Mytilus galloprovincialis	10	1 t	(Alnajar et al., 2021)
	10	1 t	(Laffon et al., 2006)
	10	>1.5 t	(Kacar et al., 2016)
	10	1 t	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)
	-	-	(Pereira et al., 2011)
	10	1 t	(Regoli et al., 2004)
	10	1 t	(Fernandez-Tajes et al., 2011b)
	10	1 t	(Frenzilli et al., 2004)
	10	1 t	(Stambuk et al., 2013)
Mytilus trossulus	-	2 t	(Thomas et al., 2007)
Mytilus sp.	10	1 t	(Akcha et al., 2004)
Nerita chamaeleon	10	1 t	(Sarkar et al., 2015)
Octopus vulgaris	-	1 t	(Raimundo et al., 2010)
Perna viridis	10	>=1 t	(Siu et al., 2004)
	-	40 min	(Krishnakumar et al., 2006)
Protothaca staminea	-	2 t	(Thomas et al., 2007)
Tapes semidecussatus	10	1.5 t	(Hartl et al., 2006)
Venerupis pullastra	10	1 t	(Fernandez-Tajes et al., 2011a)

Tabell 4: pH og tid i lysis i fisk.

pH:	Tid:	Referanse:
10	1 t	(Kammann et al. 2004)
10	1 t	(Kammann et al. 2000)
10	1 t	(Kammann et al. 2001)
10	90 min	(Kilemade et al., 2004)
10	1 t	(Mamaca et al., 2005)
10	Over natten	(Amado et al., 2006)
10	>1 t	(Amado et al., 2006)
NA	Over natten	(Shailaja et al., 2006)
10	Over natten	(Isani et al., 2009)
NA	1h, 8 C	(Katsumiti et al., 2009)
10	>2 t	(Della Torre et al., 2010)
NA	2 t	(Fasulo et al., 2010)

10	1 t	(Srut et al., 2010)
10	1.5 t	(Yang et al., 2010)
10.0 - 10.5	2-3 t	(Negreiros, 2011)
10	1 t	(Srut et al., 2011)
10	90 min	(Shirani et al., 2012)
10	1 t	(Della Torre et al., 2013)
10	1 t	(Evrard et al., 2013)
10	1 t	(Laroche et al., 2013)
10	1 t	(Dupuy et al., 2014)
10	Over natten	(Marques et al., 2014)
10	2 t	(Pavlaki et al., 2016)
13	1.5 t	(Boehler et al., 2017)
10	1 t	(Burgeot et al., 2017)
10	10-26 dager	(Hylland et al., 2017)
10	4 uker	(Sahlmann et al., 2017)
10	1 t	(Barreto et al., 2019)
10	1 t	(De brito Rodrigues et al., 2019)
		(Lima et al., 2019)