

DAUGAVPILS UNIVERSITĀTE
DZĪVĪBAS ZINĀTŅU UN TEHNOLOĢIJU INSTITŪTS



ILZE RUBEŅIŅA

BENZANTRONA LUMINOFORI TREMATODA UN NEMATODA
PARAZĪTU EFEKTĪVAI UN ĀTRAI IZPĒTEI

Promocijas darbs

Zinātniskā doktora grāda, zinātnes doktora (*Ph.D.*) bioloģijā iegūšanai
(Zooloģijas apakšnozarē)

Promocijas darba zinātniskais vadītājs:

Dr. biol., vad. pētn. Muza Kirjušina

Dr. biol. Inese Gavarāne

DAUGAVPILS 2022

Promocijas darbs ir izstrādāts Latvijā, Daugavpils Universitātē Dzīvības Zinātņu un Tehnoloģiju Institutā, Ekoloģijas departamenta Parazitoloģijas un Histoloģijas laboratorijā laika posmā no 2017. līdz 2021. gadam.

Promocijas darbu daļēji finansiāli atbalstīja projekts Nr. 1.1.1.1/16/A/211.

Darba forma: Promocijas darbs (zinātnisko publikāciju kopa) Bioloģijas nozarē, zooloģijas apakšnozarē.

Promocijas darba zinātniskais vadītājs:

Dr. biol., vad. pētniece Muza Kirjušina (Daugavpils Universitāte, Daugavpils, Latvija)

Dr. biol. Inese Gavarāne (Daugavpils Universitāte, Daugavpils, Latvija)

Darba recenzenti:

Dr. habil. med., prof., akad. Ludmila Vīksna (Rīgas Stradiņa Universitāte, Latvija)

Dr. biol., prof., akad. Arvīds Barševskis (Daugavpils Universitāte, Latvija)

Dr. habil. biol., prof. Ewa Dzika (Warminsko-Mazurski Universitāte, Polija)

Promocijas padomes priekšsēdētājs: Dr. biol., prof., akad. Arvīds Barševskis

Darba aizstāvēšana notiks: Daugavpils Universitātes Bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2022. gada ..., plkst. ..., tiešsaistē ZOOM platformā/Daugavpils Universitātē, Parādes ielā 1A, 130. auditorijā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Daugavpils Universitātes bibliotēkā, Parādes ielā 1, Daugavpilī (Latvija) un Daugavpils Universitātes interneta mājas lapā www.du.lv.

Atsauksmes sūtīt: Promocijas padomes sekretārei, Parādes iela 1A, Daugavpils, Latvija, LV-5401; mob. +371 260 02 593; e-pasts: jana.paidere@du.lv.

Padomes sekretāre: Dr. biol. Jana Paidere, Daugavpils Universitātes pētniece.

SATURS

IEVADS	17
1. LITERATŪRAS APSKATS	22
1.1. Benzantrona luminofori	22
1.2. Bioloģisko objektu fiksācija.....	25
1.3. Vispārīgs helmintu raksturojums	28
1.3.1. Trematoda klase.....	30
1.3.1.1. <i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i> Ejsmont, 1932	31
1.3.1.2. <i>Diplodiscus subclaviatus</i> (Pallas, 1760)	32
1.3.1.3. <i>Prosotocus confusus</i> (Looss, 1894)	33
1.3.1.4. <i>Diplostomum spathaceum</i> (Rudolphi, 1819)	34
1.3.2. Tips Nematoda.....	35
1.3.2.1. <i>Trichinella spiralis</i> (Owen, 1835)	38
1.3.2.2. <i>Trichinella britovi</i> Pozio, La Rosa, Murrell & Lichtenfels, 1992	39
1.4. Helmintu krāsošanas protokolu raksturojums	40
1.5. Konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas pielietojums bioloģijā.....	42
2. MATERIĀLS UN METODES	45
2.1. Benzantrona luminoforu sintēzes apraksts.....	45
2.2. Pētāmais materiāls.....	47
2.3. Pētāmā materiāla ķīmiskā fiksēšana.....	48
2.4. Krāsošanas protokoli ar specifisku benzantrona luminoforu	51
2.4.1. Trematoda paraugi (I, III)	52
2.4.2. Nematoda paraugi (II, IV)	54
2.5. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopijas metode (I, II, III, IV).....	55
3. REZULTĀTI	57
3.1. Trematoda paraugu fiksēšana un uzglabāšana	57
3.1.1. <i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i> (I)	57
3.1.2. Saldūdens trematodes (III).....	58
3.2. <i>T. spiralis</i> un <i>T. britovi</i> kāpuru fiksēšana un uzglabāšana (II, IV).....	58
3.3. Trematoda paraugu efektīva un ātra izpēte	59
3.3.1. <i>P. fasciolaemorpha</i> (I).....	59
3.3.2. Saldūdens trematodes (III).....	65
3.4. <i>T. spiralis</i> un <i>T. britovi</i> kāpuru efektīva un ātra izpēte (II, IV) un dzimumu noteikšana (II)	68
4. DISKUSIJA	73
4.1. Trematodes (I, III)	76
4.2. Nematodes (II, IV).....	83
SECINĀJUMI	88
PATEICĪBAS	90
LITERATŪRAS SARAKSTS	91

KOPSAVILKUMS

Benzantroniem tiek pievērsta ar vien lielāka uzmanība to potenciālā pielietojuma bioloģisko membrānu un biomolekulu izpētē. Bioloģiskas izcelsmes paraugu izpētē viens no soļiem turpmākai parauga analizēšanai ir parauga fiksēšana, saglabājot šūnu struktūru pēc iespējas tuvāk to dabiskajam stāvoklim. Parazītiskās slimības ir viens no faktoriem, kas ietekmē gan cilvēka, gan dzīvnieku veselības stāvokli. Trematoda klases un *Trichinella* ģints (Nematoda tips) pārstāvji ir endoparazīti, kas izraisa tādas slimības kā parafasciolopsozi (ierosinātājs *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*), diplostomozi (ierosinātājs *Diplostomum spathaceum*), trihinelozi (ierosinātājs *Trichinella spiralis*, *T. britovi*). Visu trīs parazītu izraisītās slimības tiek raksturotas kā ekonomiski nozīmīgas, turklāt trihineloze ir septītajā vietā pasaules cilvēka dzīvībai bīstamāko pārtiku izraisīto slimību topā. Tehnoloģijām attīstoties, tiek izgudrotas vai optimizētas mikroskopijas metodes, kas ietver atbilstošu protokolu izstrādi. Zinātniskajā literatūrā aprakstītie krāsošanas protokoli Trematoda un *Trichinella* parazītu paraugiem ir samērā sarežģīti. Paraugu sagatavošanai jāvelta daudz laika, cilvēka un laboratorijas resursu, turklāt *Trichinella* ģints kāpuru protokoli nav vērsti uz paša parauga izpēti, bet gan uz kāda specifiska procesa vai proteīna atpazīšanu. Izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju, paraugu izpētei ir jābūt efektīvai un ātrai fotoizbalēšanas procesa dēļ.

Pētījuma laikā sintezētie benzantrona luminofori tika izmantoti noteiktu krāsošanas protokolu izveidei un trematodes parazītu sugu ķermeņa virsmas struktūras, tegumenta, muskuļu slāņu, orgānu sistēmu izpētei. Trematodes ir hermafrodīti, kuros tika novērota gan vīrišķā, gan sievišķā reproduktīvā sistēma. *Trichinella* parazīta sugu kāpuru ātrai un efektīvai ārējās un iekšējās struktūras izpētei tika izstrādāts noteikts krāsošanas protokols, kura izveidei tika izmantoti specifiski benzantrona luminofori. Turklāt, pētījuma ietvaros sintezētais AZM luminofors un izstrādātais krāsošanas protokols tika izmantots *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru dzimumu precīzai noteikšanai.

Apkopojot pētījumā iegūtos rezultātus, tika izstrādāti noteikti krāsošanas protokoli, izmantojot specifiskus benzantrona luminoforus, *P. fasciolaemorpha* (ad.) (AM323, AZPP), *D. spathaceum* (mtc.), *Diplodiscus subclaviatus* (ad.) un *Prosotocus confusus* (ad.) (AM1, AM2, AM4, AM16, P8), *T. spiralis* un *T. britovi* (AZM, P13) efektīvai un ātrai izpētei. Noteicošie faktori optimāla krāsošanas protokola izveidei ir benzantrona luminofors, parauga uzglabāšanas apstākļi un laiks, kā arī parauga platums x garums x biezums.

ABSTRACT

Benzantrones have been given more attention due to their potential use in biological research of membranes and biomolecules. For samples of biological origins one of the most important steps for further analysis is the fixation of the sample by keeping the cellular structure as close as possible to their natural state. Parasitic diseases are one of the factors that are affecting both human and animal health. Representatives of Trematoda class and *Trichinella* genus (Nematoda phylum) are endoparasites, which cause diseases such as parafasciolopsosis (causative agent *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*), diplostomosis (causative agent *Diplostomum spathaceum*), trichinellosis (causative agent *Trichinella spiralis*, *T. britovi*). All three diseases caused by the parasites are stated as economically significant, especially trichinellosis as it is ranked as number 7 in the world's most human life-threatening food-borne parasitic disease top. As technology is evolving, microscopy methods are being optimized or invented and it includes the development of appropriate protocols too. The staining protocols for samples of Trematoda and *Trichinella* parasites, described in the scientific literature, are relatively complex. This process is very time and resources consuming as human and laboratory resources need to be spent on the preparation of samples. Furthermore, the protocols of the larvae of the genus *Trichinella* are not aimed at studying the sample itself, but for recognition of a specific process or protein. When using the confocal laser scanning microscopy, the examination of samples must be effective and rapid due to the photobleaching process.

Benzanthrone luminophores, synthesized during the study, were used in the development of staining protocols and in research of the body surface structure, tegument, muscle layers and organ systems of the species of trematodes parasites. Trematodes are hermaphrodites and both male and female reproductive systems were observed. Specific benzanthrone luminophores were used to develop staining protocols and for the study of the external and internal structure of the parasitic larvae of *Trichinella* species. In addition, the synthesised AZM luminophore and the developed staining protocol were used to accurately determine the sex of *T. spiralis* and *T. britovi* larvae.

In summary, the results of the study, certain staining protocols were developed using specific benzanthrone luminophores, *P. fasciolaemorpha* (ad.) (AM323, AZPP), *D. spathaceum* (mtc.), *Diplodiscussubclavatus* (ad.) and *Prosotocus confusus* (ad.) (AM1, AM2, AM4, AM16, P8), *T. spiralis* and *T. britovi* (AZM, P13) research. The determining factors for the development of an optimal staining protocol are selected

benzanthrone luminophore, storage conditions and time duration of the sample as well as sample's width x length x thickness.

PĒTĪJUMU REZULTĀTU APROBĀCIJA

Promocijas darbs ir balstīts uz publikācijām, kas disertācijas tekstā ir norādītas ar romiešu cipariem. Oriģinālie raksti ir publicēti ar izdevēju atļaujām.

Zinātnisko publikāciju kopa:

- I Rubenina I.**, Gavarane I., Kirilova E., Mežaraupe L., Kirjusina M. (2021) Comparison of the Benzanthrone Luminophores: They Are Not Equal for Rapid Examination of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea). *Biomolecules* 11(598):1-15. <https://doi.org/10.3390/biom11040598> (*Scopus un ISI Web of Science*), ietekmes faktors (IF) *Scopus*: 4,57; H indekss: 52
- II** Gavārane I., Kirilova E., **Rubeniņa I.**, Mežaraupe L., Osipovs S., Deksnis G., Pučkins A., Kokina I., Bulanovs A., Kirjušina M. (2019) A Simple and Rapid Staining Technique for Sex Determination of *Trichinella* Larvae Parasites by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 1-7. doi:10.1017/S1431927619015046 (*Scopus un ISI Web of Science*), IF *Web of Science*: 3,414; IF *Scopus*: 1,647; H indekss: 69
- III** Kirilova E., Kecko S., Mežaraupe L., Gavarāne I., Pučkins A., Miceviča I., **Rubeniņa I.**, Osipovs S., Bulanovs A., Pupiņš M., Kirjušina M. (2018) Novel luminescent dyes for confocal laser scanning microscopy used in Trematoda parasite diagnostics. *Acta Biochimica Polonica* 65(3):449-454. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bio.3616> (*Scopus un ISI Web of Science*), IF *Web of Science*: 1,42; IF *Scopus*: 2,102; H indekss: 78
- IV** Gavarane I., Mežaraupe L., **Rubenina I.**, Kirjusina M., Kirilova J. (2018). Staining of economically important parasitic nematodes by developed derivatives of benzanthrone luminophore. 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018, section Advances in Biotechnology, 581–587. <https://doi.org/10.5593/sgem2018/6.2> (*Scopus un ISI Web of Science*), IF *Web of Science*: 0,26; H indekss: 22

Autora ieguldījums (%) pētījumos:

	I	II	III	IV
Pētījuma ideja	50	20	30	30
Pētījuma dizains	50	30	30	40
Datu ievākšana	60	50	30	50
Datu analīze	80	50	40	60
Manuskripta sagatavošana	90	50	60	50

Zinātniskā monogrāfija:

Visu autoru ieguldījums monogrāfijas tapšanā ir vienāds, neatkarīgs no autoru pieminēšanas secības.

Gavarane I., Kirilova E., **Rubenina I.**, Osipovs S., Mezaraupe L., Puckins A., Kirjusina M. 2020. Simple and rapid luminiscent staining protocols in Helminthology. [Monograph]. Published by Daugavpils University "Saule", Daugavpils, 131 pages.

Patents:

Gavarāne I., **Rubeniņa I.**, Kirilova J., Kirjušina M. Luminiscenta metode *Trichinella* spp. parazīta kāpura dzimuma noteikšanai. Patenta pieteikuma publikācija. Latvijas Republikas Patentu valdes oficiālais izdevums. Izgudrojumi, preču zīmes un dizainparaugi 2020-03. Latvijas Republikas Patentu valde, 2020. ISSN 2255-9655 Patents iesniegts 20.12.2019. (Pieteikuma nr. P-19-76). Patenta publikācijas datums 20.03.2021., Patenta reģistra nr. 15489.

Populārzinātniskie raksti:

1. Gavārane I., Kirilova E., **Rubeniņa I.**, Mežaraupe L., Osipovs S., Deksne G., Pučkins A., Kokina I., Bulanovs A., Kirjušina M. 2020. A Simple and Rapid Staining Technique for Sex Determination of *Trichinella* Larvae Parasites by Confocal Laser Scanning Microscopy. Highlights from Microscopy and Microanalysis. Microscopy Today 28(2):58-59. doi:10.1017/S1551929519001378
2. Gavārane I., **Rubeniņa I.**, Kirilova J., Kirjušina M. 2018. Ziemassvētku tārps jeb gaļas parazīts trihinella. Medības 12(77):62-64
3. Jahundoviča I., Mickeviča I., Kalniņa I., **Rubeniņa I.**, Kirilova J., Kirjušina M. 2017. Aktualitātes diagnostikā Fluorescences *in situ* hibridizācijas metode cilvēka veselībai bīstamo parazītu diagnostikā. Latvijas ārsts 8:32-37

4. Kirjušina M., **Rubeniņa I.**, Kirillova V., Valciņa O., Jahundoviča I., Krūmiņa A., 2017. Sarkocistoze un tās ierosinātāji Latvijā. Veterinārais žurnāls 68-72
5. Kirjušina M., **Rubeniņa I.**, Kirillova V., Valciņa O., Jahundoviča I., Krūmiņa A., 2017. Sarkocistoze un tās ierosinātāji Latvijā. Latvijas ārsts. Latvijas ārstu biedrība: 38–42

Par promocijas darba rezultātiem tika ziņots starptautiskās zinātniskās konferencēs:

1. Fridmans R., Kirilova J., Mežaraupe L., **Rubeniņa I.**, Kirjušina M. 2021. Synthesis of new benzanthrone derivatives with imine and amine groups. Abstracts of the 63 Scientific conference of Daugavpils University, Daugavpils, Latvia, 15-16 April, Abstract Book, p. 33 (mutisks ziņojums)
2. Bordjuga V., Mežaraupe L., **Rubeniņa I.**, Kirjušina M. 2021. Development of staining protocol using benzanthrone luminophores for trematodes muscle research. Abstracts of the 63 Scientific conference of Daugavpils University, Daugavpils, Latvia, 15-16 April, Abstract Book, p. 30 (mutisks ziņojums)
3. Širokova J., Mežaraupe L., **Rubeniņa I.**, Kirjušina M. 2021. Comparison of different fluorescent dyes for trematoda *Prototocus confusus* imaging. Abstracts of the 63 Scientific conference of Daugavpils University, Daugavpils, Latvia, 15-16 April, Abstract Book, p. 28 (mutisks ziņojums)
4. **Rubeniņa I.**, Gavarane I., Mežaraupe L., Gravele E., Pupins M., Kirjusina M. 2021. Description of *Prototocus confusus* in *Phelophylax esculentus* complex and *Rana temporaria* from Latvia. Abstract book, 79. scientific conference Zoology and Animal Ecology, Univerity of Latvia, Riga, Latvia, January 28, 2021, Abstract Book p. 26 (mutisks ziņojums)
5. Kirjušina M., Gavarāne I., Mežaraupe L., Pupiņš M., Kirilova E., **Rubeniņa I.** 2019. Luminophore AM1 for examination of adult *Prototocus confusus* by confocal laser scanning microscopy. October 09-11, 2019. Copenhagen, Denmark, the 8th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP) and the Annual Meeting of the European Veterinary Parasitology College (EVPC), Abstract Book, p. 72 (stenda ziņojums)
6. Gavarāne I., **Rubeniņa I.**, Mežaraupe L., Kirilova E., Kirjušina M. 2019. Luminophores for *Trichinella britovi* larvae examination and sex determination using confocal laser scanning microscopy. October 09-11, 2019. Copenhagen, Denmark,

- the 8th Conference of the Scandinavian- Baltic Society for Parasitology (SBSP) and the Annual Meeting of the European Veterinary Parasitology College (EVPC), Abstract Book, p. 64 (stenda ziņojums)
7. **Rubeniņa I.**, Mežaraupe L., Gavarāne I., Kirilova E., Kirjušina M. 2019. Perspectives in studies of adult *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* by confocal laser scanning microscopy. October 09-11, 2019. Copenhagen, Denmark, the 8th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP) and the Annual Meeting of the European Veterinary Parasitology College (EVPC), Abstract Book, p. 30 (mutisks ziņojums)
 8. **Rubeniņa I.**, Kirilova E., Gavarāne I., Mežaraupe L., Kirjušina M. 2019. Benzanthrone luminophores are not equal for simple rapid examination of liver parasite *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea). September 25th - 28th, 2019. Poznan, Poland, International Conference on Biotechnology and Bioengineering, Abstract Book p. 25 (stenda ziņojums)
 9. Gavarāne I., **Rubeniņa I.**, Kirilova E., Kirjušina M. 2019. Study of fish parasites *Dactylogyrus* by confocal laser scanning microscopy. 3-6 October 2019. Jahorina, Bosnia and Herzegovina, X International Agriculture Symposium "AGROSYM 2019", Book of Abstracts, 716 pages (stenda ziņojums)
 10. Kirjušina M., **Rubeniņa I.**, Kirilova E., Gavarāne I. 2019. Benzanthrone luminophores for examination of fish *Diplostomum metacercariae*. 3-6 October 2019. Jahorina, Bosnia and Herzegovina, X International Agriculture Symposium "AGROSYM 2019", Book of Abstracts, 719 pages (stenda ziņojums)
 11. Gavarāne I., **Rubeniņa I.**, Mežaraupe L., Bulanovs A., Kirjušina M., Kirilova J. 2019. Novel benzanthrone luminophore AZM for *Trichinella britovi* larvae sex determination. 17-19 June 2019. Riga, Latvia, FEBS3+ Conference (stenda ziņojums)
 12. Kirjušina M., Gavarāne I., Mežaraupe L., **Rubeniņa I.**, Kecko S., Kirilova E. 2019. Application of novel synthesized luminophores for staining of adult Trematoda in confocal laser scanning microscopy. May 12-18 2019, Oludeniz, Turkey, INTERIM 2019 6th International congress on microscopy & spectroscopy (stenda ziņojums)
 13. Mežaraupe L., Kecko S., Kirilova E., Gavarāne I., Kirjušina M., **Rubeniņa I.** 2019. Staining Of Trematode *Parafasciolopsis Fasciolaemorpha* (Fasciolidae) With Luminiscent Benzanthrone AM323. 02-04 May 2019. Kaunas, Lithuania, 3rd International Conference „Smart Bio“, Book of Abstracts, 213 pages (stenda ziņojums)

14. Gavarāne I., **Rubeniņa I.**, Mežaraupe L., Kokina I., Kirilova E., Kirjušina M. 2019. Molecular identification of *Trichinella* spp. and sex ratio determination of parasite larvae obtained from red fox. 11-12 April 2019, Daugavpils, Latvia, 61st International Scientific Conference of Daugavpils University, Book of Abstracts, p. 13 (mutiskais ziņojums)
15. Gavarāne I., Kirilova E., Kirjušina M., Kecko S., Plaksenkova I., Mežaraupe L., **Rubeniņa I.** 2018. *Trichinella* spp. identification by molecular biology methods and larvae examination by fluorescence microscopy techniques with developed benzanthrone luminophores. October 24–27, 2018, Riga, Latvia, 7th Baltics genetics congress, Environmental and Experimental Biology 16, Book of Abstracts, p. 206 (stenda ziņojums)
16. Osipovs S., Kirilova E., Kirjusina M., Gavarane I., **Rubeniņa I.**, Mežaraupe L., Puckins A. 2018. Application of novel synthesized luminophores for microscopic visualization of biological objects. 03-06 September 2018. Caparica, Portugal, 3rd International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials (stenda ziņojums)
17. Gavarane I., Mežaraupe L., **Rubeniņa I.**, Kirjusina M., Kirilova J. 2018. Staining of economically important parasitic nematodes by developed derivatives of benzanthrone luminophore. June 30-July 9, Albena, Bulgaria, 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM, section Advances in Biotechnology, Book of Abstracts, p. 581–587 (stenda ziņojums)
18. Gavarāne I., Mežaraupe L., Kecko S., Deksnē G., **Rubeniņa I.**, Kirjušina M., Kirilova J. 2018. Using new fluorophore AZM for staining *Trichinella spiralis* for confocal laser scanning microscopy. 03-05 May 2018. Kaunas, Lithuania, 2nd International Conference „Smart Bio“, Book of Abstracts, 285 pages(stenda ziņojums)
19. Kirjušina M., Pučkīns A., Mickeviča I., Kirilova J., Osipovs S., **Rubeniņa I.**, Jahundoviča I. 2017. Diagnostic of parasites using novel luminescent dyes and confocal laser scanning microscope. 11- 14 September 2017, Krakow, Poland, EUROBIOTECH 6th Central Europe Congress of Life Sciences Eurobiotech, Book of Abstracts, 128 pages (stenda ziņojums)

Citi zinātniskie raksti piecu gadu laikā starptautiskajos zinātniskajos žurnālos un konferenču krājumos:

1. Čeirāns A., Gravele E., Gavarane I., Pupins M., Mezaraupe L., **Rubenina I.**, Kvach Y., Skute A., Oskyrko O., Nekrasova O., O. Marushchak Kirjushina M. (2021) Helminth communities in amphibians from Latvia, with an emphasis on their connection to host ecology. *Journal of Helminthology* 95:e48:1–17
2. **Rubenina I.**, Kirjusina M., Ceirans A., Gravele E., Gavarane I., Pupins M., Krasnov BR. (2021) Environmental, anthropogenic, and spatial factors affecting species composition and species associations in helminth communities of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) in Latvia. *Parasitology Research* 120:3461–3474
3. Kirilova E., Mickeviča I., Mežaraupe L., Pučkins A., **Rubeniņa I.**, Osipovs S., Kokina I., Bulanovs A., Kirjušina M., Gavarāne I. (2019). Novel dye for detection of callus embryo by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Luminescence* 34(3):353-359
4. Gavarāne I., Trofimova J., Mališevs A., Valciņa O., Kirjušina M., **Rubeniņa I.**, Bērziņš A. (2018). DNA extraction from amoebal isolates and genotype determination of *Acanthamoeba* from tap water in Latvia. *Parasitology Research* 117(10):3299-3303
5. Kokina I., **Rubeniņa I.**, Bankovksa L., Mickeviča I., Gavarāne I. (2018). Case study of microsatellite polymorphism of European perch in selected commercially important lakes of Latvia. *Biologia* 73:273-280
6. **Rubeniņa I.**, Kirjušina M., Bērziņš A., Valciņa O., Jahundoviča I (2017). Relationships between free-living amoeba and their intracellular bacteria. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B* 71(4):259-265

Citu tēmu konferenču tēzes pēdējo piecu gadu laikā:

1. Gravele E., Mezaraupe L., Gavarane I., Pupins M., Ceirans A., **Rubenina I.**, Skute A., Kirjusina M. 2021. First data of helminthofauna of the larvae of tailed amphibians *Lissotriton vulgaris* and *Triturus cristatus* in Latvia. 9th Conference of the Scandinavian - Baltic Society for Parasitology, April 21 - 23, 2021. Vilnius, Lithuania. Abstract Book, 88 pages (stenda ziņojums)
2. Jahundoviča I., Kokina I., Mickeviča I., **Rubeniņa I.** 2017. Fluorescence *in situ* hybridisation for various species: necessity of synthesised new fluorophores. The 59th

International Scientific Conference of Daugavpils University, April 06-07, 2017, Daugavpils, Latvia (mutisks ziņojums)

3. **Rubeniņa I.**, Kokina I., Mickeviča I., Bankovska L., Jahundoviča I. 2017. Assessment of polymorphism in ten loci in Latvian Eurasian perch populations from two lakes. The 59th International Scientific Conference of Daugavpils University, April 06-07, 2017, Daugavpils, Latvia (stenda ziņojums)
4. Mickeviča I., **Rubeniņa I.**, Kirilova J., Osipovs S., Kokina I., Kirjušina M., Jahundoviča I. Confocal laser scanning microscopy for smart and simple diagnostics of different in vitro callus cell types. 6th Central European Congress of Life Science EUROBIOTECH, September 11-14, 2017, Krakow, Poland (stenda ziņojums)

SAĪSINĀJUMI

ad.	no angļu val. <i>adult</i>
ASV	Amerikas Savienotās Valstis
C3	C-3 pozīcija
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindols
DU	Daugavpils Universitāte
DZTI	Dzīvības Zinātņu un Tehnoloģiju Institūts
FITC	fluorescīna izotiocianāts
ILP	intramolekulu lādiņu pārnese
KLSM	konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija
mm	milimetri
mtc.	metacerkārijs
Nm	nanometri
PBS	fosfātu buferšķīdums
ROI	no angļu val. <i>regions of interest</i>
SD	no angļu val. <i>standard deviation</i>
TRITC	tetrametil-rodamīna izotiocianāts
µm	mikrometri
3D	trīsdimensiju

PROMOCIJAS DARBĀ IEVIETOTO TABULU SARAKSTS

Tabulas numurs	Tabulas nosaukums	Lappuses numurs
1. tabula	Ķīmisko fiksatoru iedalījums (pēc Bacallao et al., 2006; Howat & Wilson, 2014)	26
2. tabula	Plakantārpu un nematodes vispārējs salīdzinājums (pēc Castro 1996)	29
3. tabula	<i>Trichinella</i> ģints sugu vispārējais raksturojums	37
4. tabula	Sintezēto benzantronu luminoforu apraksts	46
5. tabula	Pētījumā izmantotie ķīmiskie fiksatori	49
6. tabula	Trematoda parazitū sugu paraugu ķīmiskā fiksēšana un uzglabāšana	49
7. tabula	<i>T. spiralis</i> un <i>T. britovi</i> parazitū sugu paraugu ķīmiskā fiksēšana un uzglabāšana	51
8. tabula	Benzantronu luminoforu funkcionālās grupas un krāsoto paraugu raksturojums	52
9. tabula	Ķīmisko fiksatoru <i>P. fasciolaemorpha</i> paraugos radīto fizisko izmaiņu salīdzinājums	58
10. tabula	Ķīmisko fiksatoru trihinella paraugos radīto fizisko izmaiņu salīdzinājums	59
11. tabula	Ķīmisko fiksatoru un benzantrona luminofora rezultātu salīdzinājums, izmantojot KLSM	63

PROMOCIJAS DARBĀ IEVIETOTO ATTĒLU SARAKSTS

Attēla numurs	Attēla nosaukums	Lappuses numurs
1. attēls	Plakantārpu klasifikācija (pēc Norena et al., 2015)	30
2. attēls	<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i> attīstības cikls (pēc Keidāne et al., 2017)	32
3. attēls	<i>Prosotocus confusus</i> attīstības cikls (Rubeniņa, 2022)	34
4. attēls	<i>Diplostomum spathaceum</i> attīstības cikls (Rubeniņa, 2022)	35
5. attēls	Nematoda tipa dendrogramma, balstoties uz SSU-sekvences datu kopu (pēc Blaxter, 1998)	36
6. attēls	<i>Trichinella</i> spp. attīstības cikls (pēc Andrade-Becerra et al., 2017)	39
7. attēls	<i>Trichinella britovi</i> izplatība (pēc Bruschi & Pozio, 2019)	40
8. attēls	Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa darbības princips (pēc Schneckeburger et al., 2019; Guida et al., 2021)	43
9. attēls	Pētījuma dizains (Rubeniņa, 2022)	45
10. attēls	Pētījumā izmantotais materiāls (Rubeniņa, 2022)	48
11. attēls	Vispārēja krāsošanas gaita trematodes paraugiem (Rubeniņa, 2022)	53
12. attēls	Vispārēja krāsošanas gaita nematodes paraugiem (Rubeniņa, 2022)	54
13. attēls	<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i> (ad.) nekrāsots un ķīmiski nefiksēts paraugs (Rubeniņa, 2021)	60
14. attēls	<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i> (ad.) krāsota ar AZPP, fiksators 70% etanols (viens optiskais griezums) (Rubeniņa, 2021)	61
15. attēls	<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i> (ad.) krāsota ar AZPP, fiksators 70% etanols (viens optiskais griezums) (Rubeniņa, 2021)	61
16. attēls	<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i> (ad.) krāsota ar AZPP, fiksators AFA (viens optiskais griezums) (Rubeniņa, 2021)	62
17. attēls	<i>Diplostomum spathaceum</i> metacerkārijs krāsots ar AM16 (Mežaraupe, 2018)	65
18. attēls	<i>Diplostomum spathaceum</i> metacerkārijs krāsots ar AM2 (Rubeniņa, 2018)	66
19. attēls	<i>Prosotocus confusus</i> shematisks zīmējums (Rubeniņa, 2020)	67
20. attēls	Pieaudzis <i>Prosotocus confusus</i> krāsots ar AM1 (ārējā uzbūve) (Rubeniņa, 2018)	67
21. attēls	Pieaudzis <i>Prosotocus confusus</i> krāsots ar AM1 (iekšējā struktūra) (Rubeniņa, 2018)	68
22. attēls	Parauga autofluorescences bilde un autofluorescences grafiki, kas atbilst dažādiem absorbcijas viļņu garumiem (Mežaraupe, 2019)	69
23. attēls	KLSM attēls ar <i>Trichinella</i> kāpura priekšējo galvas galu (Rubeniņa, 2019)	70
24. attēls	KLSM attēls ar trihinelas kāpura aizmugurējo galu (Rubeniņa, 2019)	71
25. attēls	KLSM attēls ar trihinela kāpura reproduktīvo un gremošanas sistēmām (Rubeniņa, 2019)	71
26. attēls	<i>Trichinella britovi</i> (Rubeniņa, 2018)	72
27. attēls	KLSM attēlā atzīmēta gala zarna gan <i>trichinella</i> māfītei, gan tēviņam (Rubeniņa, 2019)	72

IEVADS

Pētījuma aktualitāte

Mikroskopijai attīstoties, tā būtiski mainīja bioloģijas pētījumu gaitu. Mikroskopu izmanto dažādu dzīvības procesu izpētē, tādējādi raksturojot organismu mikroskopisko uzbūvi. Konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas metode ir viens no veidiem kā pētīt parazitāru iekšējo un ārējo struktūru, iegūstot gan detalizētus, gan kvantitatīvus, gan kvalitatīvus datus (Jurberg et al., 2008; Kirjusina et al., 2018; Terenina et al., 2018; Mochalova et al., 2019; Terenina et al., 2020).

Helminthu sugas ir iesaistītas konkurējošās un plēsonīgās mijiedarbībās gan ar saimnieku, gan ar ne-saimnieku taksoniem, tādējādi tiek parādīts parazitāru nozīmīgums ekosistēmās un barības ķēdēs (Tompkins et al., 2011). Trematoda klase zināma šistosomu un pārtikas bojājošu trematodes pārstāvju dēļ, kas invadējusi vairāk kā 294 miljonu cilvēku visā pasaulē (*World Health Organisation*, 2015, 2019; Bennett & Robinson, 2021). Savukārt, viena no pasaulē visplašāk zināmajām parazitāru ģintīm ir *Trichinella* ģints (Nematoda tips), jo nematodes parazitā izraisītā zoonoze – trihineloze ir ierindota pasaules cilvēkam bīstamāko slimību topa desmitniekā (Pozio & Zarlenga, 2019). Turklāt, pēc pasaules veselības organizācijas datiem, ik gadu 10 000 cilvēku tiek reģistrēti invadēšanās ar trihinellu (*World Health Organization*, 2022).

Gan Trematoda klase, gan *Trichinella* ģints pārstāvji ir dažādu zoonožu ierosinātāji, taču mājdzīvnieku un savvaļas dzīvnieku helminti vēl jo projām nav tik labi izpētīti kā antroponozes (Sah et al., 2020).

Bioloģisko objektu izpētē bieži vien tiek izmantoti specifiski luminofori, tādējādi sniedzot informāciju par kādu konkrētu procesu, orgānu vai orgānu sistēmu (Byrne et al., 2016; Chen et al., 2018; Holden et al., 2021). Izmantojot fluorescento mikroskopiju, liela nozīme tiek piešķirta luminoforiem (Ndao, 2009). Savulaik parazitāru struktūras krāsošanā tika plaši izmantotas fluorescējošās krāsvielas akridīna oranžais un rodamīns C (Geller & Timonov, 1969a,b; Stankiewicz et al., 1996; Janssen 1998), bet mūsdienās sāka parādīties citas sintezētās krāsvielas bioloģisko organismu morfoloģiskai izpētei (Dapson, 2007; Fakhar & Ghobaditara, 2016). Pēdējo gadu laikā popularitāti guvuši benzantrona luminofori un to izmantošana dod iespēju noteikt specifiskus lipīdus un proteīnus (Zhytniakivska et al., 2014a; Ryzhova et al., 2016). Benzantrona luminofori ir zināmas kā fluorescentās zondes, kas atkarībā no krāsas struktūras emitē noteiktā spektrālajā reģionā: dzeltens – zaļš vai sarkans - violets (Khrolova et al., 1984). Dažas benzantrona krāsas tiek izmantotas, membrānu strukturālo izmaiņu novērošanai un

nukleīnskābju savienšanās izpētei (Dobretsov, 1989; Yang et al., 1999). Turklāt, pētījumi apstiprinājuši, ka tos var izmantot bioloģisku objektu krāsošanai. Lai gan krāsošana ar benzantrona luminoforiem krietni vien samazina paraugu sagatavošanas laiku, katrai organismu grupai ir jāpiemeklē specifisks benzantrona luminofors (Kirjusina et al., 2018; Kirilova et al., 2019).

Pētījumos aprakstītie trematodes paraugu standarta sagatavošanas protokoli konfokālai lāzerskenējošai mikroskopijai aizņem vairāk kā vienu vai divas dienas (Krupenko, 2014; Krupenko & Dobrovolskij; 2018; Krupenko, 2019) un ir koncentrēti uz kādu noteiktu sistēmu izpēti, piemēram, muskuļu sistēmu (Krupenko, 2019), nervu sistēmu (Kremnev et al., 2020, 2021). Paraugu sagatavošanas posmā tiek izmantoti dažādi paraugu mazgāšanas un fiksēšanas šķīdumi, piemēram, paraformaldehīds, fosfātu buferšķīdums jeb PBS ar 0.1% nātrija azīdu, u.c. (Krupenko & Gonchar, 2017a,b; Krupenko et al., 2016). Rezultātā izstrādātie protokoli prasa daudz resursu un cilvēka darba stundu. Savukārt, trihinellas krāsošanas protokoli bieži vien nav paredzēti paša kāpura struktūras noteikšanai, bet gan specifisku procesu novērošanai, piemēram, imūnsistēmas atbildes reakcijai (Bai et al., 2012), anti-trihinellu vakcīnu pārbaudei (Hu et al., 2021), noteiktu proteīnu lokalizēšanai (Hernandez-Bello et al., 2008; Morales-Montor, 2022), mijiedarbības izpētei starp nematodi un mukuļu šūnām *in vitro* (Bai et al., 2011). Tomēr trūkst luminoforu, kas spētu iekrāsot parazītu vispārējo struktūru, nepatērējot daudz resursu un laika parauga sagatavošanai konfokālai lāzerskenējošai mikroskopijai.

Parazītu mikroskopiskā izpēte ietver dzimumu noteikšanu. Viens no populāciju raksturlielumiem ir dzimumstruktūra. Populācijas dzimuma proporcija un struktūra sniedz informāciju par populācijā notiekošiem procesiem, kā piemēram, parazīta saimnieka dzimuma ietekme uz parazīta dzimumu proporciju vai parazīta dzimumu struktūra noteiktos reģionos (Codina et al., 2021). Kozek (1975) un Li et al. (1999) ir mēģinājuši noteikt trihinellu kāpuru dzimumus, uzskaitot morfoloģiskās pazīmes, kuras atšķir mātīti no tēviņa. Tomēr, mēģinājumi nav bijuši pārlietu veiksmīgi, jo, izmeklējot paraugus ar gaismas mikroskopiju, ir samērā grūti atšķirt pazīmes, kuras prasa lielu precizitāti. Piemēram, kā viena no dzimuma atšķiršanas pazīmēm ir kāpuru primārie apvalki, kas var būt raksturīgi noteiktai kāpura attīstības stadijai. Tomēr tos nav viegli atšķirt jau tad, kad kāpuri ir sargrupēti pēc to attīstības stadijas, bet dzīvnieku muskulatūrā var būt dažādu attīstības stadiju kāpuri (Weller, 1943; Kozek, 1975). Vēl viena pazīme pēc kuras ir iespējams noteikt kāpuru dzimumu ir gala zarnas garums, bet ar gaismas

mikroskopiju iegūtie mērījumi var būt neprecīzi (Villega, 1966).

Helmintoloģija ir starpdisciplināra bioloģijas nozare, tāpēc cilvēku un dzīvnieku parazītu morfoloģisko pazīmju, saimnieka-parazītu attiecību, parazītu fizioloģijas, etioloģijas, epizootoloģijas, u.c. procesu pētīšanā ir jāsadarbojas ar citu nozaru pārstāvjiem, piemēram, ekologiem, ķīmiķiem, pilnveidojot diagnostikas, fizioloģiskās, mikroskopijas un molekulārās metodes.

Pētījumu novitāte

Tika veikts pētījums, kura ietvaros tika sintezēti septiņi benzantrona luminofori (AM323, AZPP, AM1, AM2, AM4, AM16, P8,) un izstrādāti noteikti krāsošanas protokoli Trematoda klases dažādu parazītu sugu izpētei, izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju. Izstrādātie krāsošanas protokoli ir piemēroti efektīvai un ātrai dažādos ķīmiskos fiksatoros fiksētiem *P. fasciolaemorpha* (ad.), *D. spathaceum* (ad.), *D. subclaviatus* (mtc.) un *P. confusus* (ad.) izpētei. Papildus tam tika sintezēti divi benzantrona luminofori (AZP un P13) un izstrādāti noteikti krāsošanas protokoli Nematoda tipa parazītu sugu efektīvai un ātrai izpētei. Izstrādātie krāsošanas protokoli ir piemēroti trīs dažādu trihinella paraugu tipu izpētei: paraugiem, kuri uzglabāti 96,6% etanolā, kāpuriem sasaldētā dzīvnieku muskulatūrā vai nesen ievākta dzīvnieku muskulatūra, no kuras vienas dienas laikā izdalīti trihinellu kāpuri un tie fiksēti ķīmiskos fiksatoros. Turklāt, vizualizācijas rezultātā tika novērotas morfoloģiskas atšķirības starp *T. spiralis* un *T. britovi* sugu paraugiem. Pētījuma laikā tika sintezēts AZM luminofors un izstrādāts noteikts krāsošanas protokols *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru dzimumu noteikšanai, balstoties uz kāpura gala zarnas garumu.

Izstrādātie protokoli ir efektīvi, jo dažādām parazītu sugām tika piemeklēti specifiski benzantrona luminofori. Turklāt, izstrādātie protokoli ietaupa paraugu sagatavošanas laiku un laboratorijas resursus, tādējādi vairs nav jāvelta vairākas stundas vai dienas parauga sagatavošanai konfokālai lāzerskenējošai mikroskopijai.

Pētījuma praktiskais pielietojums

Promocijas pētījuma laikā izstrādātie krāsošanas protokoli ir nozīmīgi Trematoda klases un Nematoda tipa dažādu parazītu sugu populācijas pētījumos un var tikt izmantoti, papildinot sugu taksonomiskos aprakstus, aprakstot mijiedarbību starp Trematoda un starp Nematoda sugām un veicot salīdzinošos pētījumus.

Promocijas darba laikā izstrādātais krāsošanas protokols un sintezētais

specifiskais benzantrona luminofors *T. spiralis* un *T. britovi* kāpura dzimuma noteikšanai var tikt tālāk izmantots vides kvalitātes pētījumiem, kā arī cilvēka vai dzīvnieka ārstēšanas plāna izstrādāšanā vai koriģēšanā. Noteiktais krāsošanas protokols sniedz precīzu rezultātu par parazīta dzimumu, līdz ar to krāsošanas protokols un specifisks benzantrona luminofors var tikt izmantoti parazīta dzimuma proporcijas noteikšanas pētījumos, identificējot populācijas dzimumu sadalījuma ietekmējošos faktorus, nosakot dzimumu sadalījumu dažādos reģionos un saimniekos, kā arī var tikt izmantoti parazīta apkaršanas metožu izstrādē, ietekmējot parazīta dzimuma proporciju. Pētījuma laikā izstrādātie krāsošanas protokoli var tikt izmantoti ne tikai *T. spiralis* un *T. britovi* sugām, bet arī citu *Trichinella* spp. kāpuru analīzei un dzimuma noteikšanai.

Promocijas darbā iegūtās zināšanas tiek izmantotas praktiskās nodarbībās, lekcijās, zinātniski pētniecisko darbu, māszinību, fizioterapijas, bioloģijas bakalauru un maģistra darbu izstrādē.

Pētījuma objekts

Trematoda klases un Nematoda tipa parazīti.

Pētījuma priekšmets

Trematoda klases un Nematoda tipa dažādu parazītu sugu efektīva un ātra izpēte, izmantojot specifisku benzantrona luminoforu un izstrādājot noteiktu krāsošanas protokolu.

Pētījuma hipotēze

Dažādu parazītu sugu efektīvai un ātrai izpētei ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju ir piemērots noteikts krāsošanas protokols, izmantojot noteiktu ķīmisko fiksatoru un specifisku benzantrona luminoforu.

Pētījuma mērķis

Izstrādāt krāsošanas protokolu ar benzantrona luminoforiem Trematoda klases un Nematoda tipa dažādu parazītu sugu efektīvai un ātrai izpētei, izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju.

Lai sasniegtu pētījuma mērķi, izvirzīti šādi **pētījuma uzdevumi**:

1. Aprobēt sintezētos benzantrona luminoforus Trematoda klases un Nematoda tipa dažādu parazītu sugu efektīvai un ātrai izpētei (**I, II, III, IV**).

2. Izstrādāt krāsošanas protokolu, izmantojot specifisku benzantrona luminoforu, Trematoda parazitū sugu paraugiem, fiksētiem dažādos ķīmiskos fiksatoros, efektīvai un ātrai izpētei (**I, III**).
3. Izstrādāt krāsošanas protokolu, izmantojot specifisku benzantrona luminoforu, trīs dažāda tipa Nematoda parazitū sugu paraugiem, fiksētiem dažādos ķīmiskos fiksatoros, efektīvai un ātrai izpētei un dzimuma noteikšanai (**II, IV**).
4. Izanalizēt sintezētā benzantrona luminofora piemērotību un krāsošanas protokola efektivitāti Trematoda klases un Nematoda tipa parazitū sugu ātrai izpētei, pielietojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju (**I, II, III, IV**).

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes:

1. Sintezētie benzantrona luminofori ir piemēroti Trematoda klases un Nematoda tipa dažādu parazitū sugu efektīvai un ātrai izpētei, izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju.
2. Ķīmiskie fiksatori ietekmē pētāmā parauga detalizētu izpēti un noteiktam luminoforam ir piemērots noteikts fiksators.
3. Parazitū krāsošanas soļa ilgumu ietekmē pētāmā parauga izcelsme – poikiloterms saimnieks vai homoterms saimnieks.
4. Efektīva un ātra protokola izstrāde sniedz detalizētus rezultātus izpētē ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu divu stundu laikā.
5. Specifisks benzantrona luminofors un noteikts krāsošanas protokols ir piemērots *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru dzimuma noteikšanai.

1. LITERATŪRAS APSKATS

Šajā sadaļā tiek apskatīti benzantrona luminofori un aprakstītas īpašības, kas apstiprina to izmantošanu bioloģijas pētījumos. Dažādu paraugu izpētē sava loma ir izvēlētam ķīmiskam fiksatoram, tāpēc sadaļā ir sniegts raksturojums par helmintoloģijā izmantotiem ķīmiskiem fiksatoriem. Tiek sniegts vispārējs raksturojums par helmintiem, to iedalījumu un sociālekonomisko ietekmi. Tiek apskatītas Trematodes klases un Nematodes tipa parazītu sugas, aprakstot parazītu sugas saimniekus, izraisīto slimību, izplatību un attīstības ciklu. Sadaļā tiek apskatīti zinātniskajā literatūrā aprakstītie helmintu krāsošanas protokoli un konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas izmantošanas iespējas parazītu efektīvai (detalizētai) un ātrai izpētei.

1.1. Benzantrona luminofori

Benzantrona luminofori ir zināmi kā fluorescentie luminofori, kas atkarībā no luminofora struktūras emitē noteiktā spektrālā reģionā: dzeltens – zaļš vai sarkans - violets. Vairākiem luminoforiem piemīt augsta fluorescences spēja un tie tiek plaši pielietoti kā lāzeru gaismas (Khrolova et al., 1984), dienasgaismas fluorescences pigments (Carlini et al., 1982), kā lipofīliskā fluorescences zonde bioķīmiskajos un medicīnas pētījumos (Gonta et al., 2013). Benzantrona luminoforiem ir vairākas vērā ņemamas spektrālās īpašības, tādas kā augsts izbalēšanas koeficients, noteikta Stoksa nobīde (Ryzhova et al., 2016), nebūtiska fluorescences ūdens bāzē, augsta fluorescences parametru jutība pret apkārtējās vides polaritāti (Refat et al., 2004; Zhytniakivska et al., 2014). Benzantrona luminoforiem piemīt intramolekulu lādiņu pārnese (ILP) spēja hromoforiskā sistēmā, kas rodas starp elektrodonoru grupām C3 pozīcijā un elektronu akceptoriem karbonīdgrupā (Refat et al., 2004; Kirilova et al., 2008). Hromoforiskajām sistēmām ir interesantas ķīmiskās un spektrālās iespējas. Elektronu ierosme šādās sistēmās bieži ir saistīta ar ievērojamu lādiņa pārdalīšanos. Intramolekulāra lādiņa pārdalīšanās pēc elektriskā uzbudinājuma ir fundamentāls fiziokīmiskais process. Plaši pielietota metode šī procesa pētīšanā ir elektriskā dipola momenta noteikšana dažādos elektriskajos stāvokļos (Grabchev & Moneva, 1998). Dipola moments ataino tiešu elektronu sadalījumu ar zināmu ģeometriju. Tā ir fizikāla konstante, ko iegūst ar eksperimentālām un teorētiskām metodēm (Siddlingeshwar et al., 2011). Benzantrona luminoforu spēja veidot ILP stāvokli rada nozīmīgu luminofora dipola momenta palielināšanos pēc ierosmes, kā rezultātā tiek ierosināta šķīdinātāja dipola re-orientēšanās ap ierosinātā stāvokļa dipolu (Ryzhova et al., 2016). Tādējādi luminoforus var izmantot,

pētot ar membrānu saistītus procesus, it īpaši tos, kas saistīti ar polaritātes un viskozitātes izmaiņām lipīdu dubultslānī (Siddlingeshwar et al., 2011).

Benzantrona savienojumi ir guvuši lielu interesi kā biomedicīnu tehnoloģiju fluorescentās zondes, pateicoties tieši to spektrālajām īpašībām (Konstantinova et al., 1998; Refat et al., 2004; Ryzhova et al., 2016; Tarabara et al., 2021). Pirms vairāk kā četrdesmit gadiem 3-metoksibenzantrons tika pieminēts kā luminofors, kas ir jutīgs pret biomembrānu fizioloģiskajām izmaiņām (Dobretsov et al., 1978; Dobretsov, 1983), konformācijas izmaiņām olbaltumvielās (Sorokovoi et al., 1974) un limfocītu diferenciāciju (Korkina et al., 1978; Baglaev et al., 1982). Vēlāk tika ziņots, ka 3-metoksibenzantronam piemīt augsta citotoksicitāte pret dzīvu šūnu. Tajā pašā laikā tika novērots, ka metoksi grupas aizvietošana ar N-saturošo grupu mazināja benzantrona luminoforu citotoksicitāti (Kirilova & Ivanova, 2011). Benzantrona luminoforiem, sauktas par hidrofobiski solvatochromiskām krāsvielām, piemīt augsta lipofilitāte (Zhytniakivska et al., 2014), spēja identificēt un strukturāli raksturot amiloidās fibrillas (Vus et al., 2012, 2014a,b; Zhytniakivska et al., 2014). Turklāt, pētījumos ziņots, ka limfocītu funkcionālās aktivitātes atpazīšanai izmantoti benzantrona luminofori (Kalnina et al., 2007) un tikuši piemēroti mikroskopijas vizualizācijai Trematoda sugu parazītiem (Kirjusina et al., 2018).

Izmantojot jebkuru luminoforu, ir jāņem vērā fotoizbalēšanas process. Fotoizbalēšana ir neatgriezenisks process, kurā fluorofors pamazāk sāk izzust (Eggeling et al., 1999), tas notiek kā statisks process pēc daudziem fotonu absorbcijas un emisijas cikliem. Fotoizbalēšanas rezultātā parauga izpētes laikā ir novērojama parauga izbalēšana un fluorescences intensitāte krītas, kas nozīmē, ka iegūtā rezultāta kvalitāte sāk pamazām zust (Zondervan et al., 2004; Han et al., 2021). Vēl jo vairāk tas nozīmē, ka nekad netiks iegūti tik detalizēti dati kā pētot paraugu pirmajā reizē. Fotoizbalēšanu varētu uzskatīt par luminoforu galveno īpašību, jo tā ietekmē kopējo emitēto fotonu skaitu un iegūtā rezultāta kvalitāti. Līdz ar to tiek sintezēti arvien jauni luminofori, kuros tiek mēģināts palēlināt fotoizbalēšanas procesa norisi (Demchenko, 2020).

Luminofora sintēzes process sākas ar 3-aminobenzantrona iegūšanu. Benzantrona luminoforu sintēzē visbiežāk tiek izmantoti mono aizvietotie benzantroni ar 3-benzantronu, kas nozīmē, ka 3. stāvoklī ir amido ar heterociklisku amino (Gonta et al., 2013; Kirjusina et al., 2018), amidino (Siddlingeshwar et al., 2011; Gonta et al., 2013) vai amino grupu (Trusova et al., 2012; Ryzhova et al., 2016). Tālāk aplūkoti daži benzantrona luminofori.

- 3-N-(2-piperidinilacetamido)benzantrons (AZPP). Sintēzes laikā tiek iegūti tumši oranži 3-N-(2-piperidinilacetamido)benzantrona kristāli. Iegūtie kristāli šķīst hloroformā un dihlorometānā, bet ir mazāk šķīstoši ogļūdeņražos un alkoholos (Zaičenko, 2014).
- 2-bromo-3-N-(N', N'-dimetilformamidino)benzantrons (AM323). Sintēzes laikā tiek iegūti oranži 2-bromo-3-N-(N', N'-dimetilformamidino)benzantrona kristāli. Iegūtie kristāli šķīst hloroformā, dihlorometānā un ogļūdeņražos, bet ir mazāk šķīstoši alkoholos (Kirilova et al., 2018).
- 3-N-[2-(4-morfolinil)acetamidino]benzantrons (AZM). Sintēzes laikā tiek iegūti 3-N-[2-(4-morfolinil)acetamidino]benzantronadzeltēni-oranži kristāli. Iegūtie kristāli šķīst hloroformā, dihlorometānā, bet ir mazāk šķīstoši ogļūdeņražos un alkoholos (Gavarane et al., 2019).
- 3-N-(N', N'-dimetilbenzamidino)benzantrons (AM1). Sintēzes laikā tiek iegūts 3-N-(N', N'-dimetilbenzamidino)benzantrona dzeltens pulveris. Iegūtais pulveris šķīst hloroformā, dihlorometānā un ogļūdeņražos, bet ir mazāk šķīstoši alkoholos (Kirilova et al., 2009).
- 3-N-(N', N'-dimetilacetamidino)benzantrons (AM2). Sintēzes laikā tiek iegūts 3-N-(N', N'-dimetilacetamidino)benzantrona sarkans pulveris. Iegūtais pulveris šķīst hloroformā, dihlorometānā un ogļūdeņražos, bet ir mazāk šķīstoši alkoholos (Kirilova et al., 2009).
- 3-N-(N', N'-dietilacetamidino)benzantrons (AM4). Sintēzes laikā tiek iegūti 3-N-(N', N'-dietilacetamidino)benzantrona oranži kristāli. Iegūtie kristāli šķīst hloroformā, dihlorometānā un ogļūdeņražos, bet ir mazāk šķīstoši alkoholos (Kirilova et al., 2009).
- 3-N-[N'-(4-metilfenil)acetamidino]benzantrons (AM16). Sintēzes laikā tiek iegūti 3-N-[N'-(4-metilfenil)acetamidino]benzantrona oranži kristāli. Iegūtie kristāli šķīst hloroformā, dihlorometānā un ogļūdeņražos, bet ir mazāk šķīstoši alkoholos (Gonta et al., 2013).
- 3-N-piperidinilbenzantrons (P8). Sintēzes laikā tiek iegūti 3-N-piperidinilbenzantrona sarkani kristāli. Iegūtie kristāli šķīst hloroformā, dihlorometānā un ogļūdeņražos, bet ir mazāk šķīstoši alkoholos (Kirilova et al., 2008).

- 3-N-[4-(2-piridil)piperazin-1-il]benzantrons (P13). Sintēzes laikā tiek iegūti 3-N-[4-(2-piridil)piperazin-1-il]benzantronsarkani kristāli. Iegūtie kristāli šķīst hloroformā, dihlorometānā un ogļūdeņražos, bet ir mazāk šķīstoši alkoholos (Gavarane et al., 2018).

1.2. Bioloģisko objektu fiksācija

Jebkāda veida parauga apstrāde var ietekmēt parauga vizualizācijas izšķirtspēju un to formu trīsdimensiju (3D) telpā (Elliott, 2020). Fiksācijas mērķis ir saglabāt šūnu struktūru pēc iespējas tuvāk to dabiskajam stāvoklim cik vien tas ir iespējams, kamēr paraugs tiek pakļauts dažādiem apstrādes procesiem un mikroskopijai (Held, 2015). Runājot par ķīmiskiem fiksatoriem būtu jāsaprot, ka fiksatoru izmantošana nebūt nenozīmē, ka fiksators nosaka parauga formu, struktūru vai padara šūnas makromolekulas nekustīgas. Lielākoties paraugu fiksēšana ir tikai ķīmiski vai fiziski procesi, kas izraisa metabolisma apstāšanos vai saglabā mikrostruktūras līdz zināmam struktūru lielumam, iznīcinot citas struktūras, piemēram, enzīmus (Bacallao et al., 2006). Lai gan viens no vecākajiem bioloģisko objektu fiksatoriem ir formalīns, kas tiek izmantots kopš seniem laikiem (Specht et al., 2017), tomēr arī ar formalīnu izstrādātie fiksēšanas protokoli nav perfekti. Būtībā neviens no izstrādātajiem fiksēšanas protokoliem nav ideāls, bet protokola nepilnības bieži vien tiek maskētas aiz fakta, ka plāknē parauga dimensijas attēlu veido parauga piestiprināšana pie priekšmetstikliņa vai pie kādas citas pamatnes. Līdz ar to, izmeklējot paraugus ar mikroskopijas metodi, var tikt novērota parauga sašaurināšanās vai malu apgriešana. Malu apgriešana vai parauga saraušanās var būtiski ietekmēt izpētes rezultātus, jo daļa informācijas var tikt pazaudēta. Šis faktors būtu jāņem vērā paraugu izpētes laikā ar KLSM metodi, jo tie tiek skatīti pa optiskā griezuma slāņiem (Z solis) (Elliott, 2020).

Organiskie šķīdinātāji, piemēram, alkohols un acetons noņem lipīdus un dehidratē šūnu, vienlaikus nogulsnējot olbaltumvielas. Aditīvie ķīmiskie fiksatori, veidojot intermolekulārus tiltus, visbiežāk izmantojot brīvās amino grupas, veido savienotu antigēnu tīklus. Aditīvie ķīmiskie fiksatori saglabā šūnu struktūru labāk nekā organiskie šķīdinātāji, bet samazina dažu šūnas sastāvdaļu antigenitāti un ir vajadzīgs permeabilizācijas solis, antiķermenīšu iekļūšanai paraugā. Katrai fiksācijas metodei ir savi plusi un mīnusi, tāpēc ir vajadzīga fiksācijas protokolu optimizācija specifiskiem objektiem un ir jāizmēģina dažādi ķīmiskie fiksatori vieniem un tiem pašiem paraugiem, rezultātā nosakot optimālāko fiksācijas metodi konkrētiem bioloģiskiem objektiem

(Hegazy & Hegazy, 2015).

Lai fiksators būtu efektīvs, tam ir jāiesūcas paraugā. Protams, ir vēlama ātra fiksatora iesūkšanās paraugā, kas nozīmē, jo plānāks paraugs, jo ātrāk var sākties struktūru fiksēšana. Ir zināmi vairāki fiksatori, kas tiek pielietoti bioloģisko objektu fiksēšanai (Farmilo & Stead, 2009), novēršot šūnu fermentatīvo darbību un audu sadalīšanos (Bamidele, 2007). Ķīmisko fiksatoru iedalījums ir apkopots 1. tabulā.

1. tabula

Ķīmisko fiksatoru iedalījums (pēc Bacallao et al., 2006; Howat & Wilson, 2014)

Ķīmiskais fiksators	Fiksācijas metode
Etanols	Denaturācija
AFA šķīdums	Denaturācija, ķēžu veidošana starp aminoskābēm
Karvoja šķīdums	Denaturācija
Bouina šķīdums	Denaturācija, ķēžu veidošana starp aminoskābēm
10% neitrāli buferēts formalīns	Ķēžu veidošanu starp aminoskābēm

Koagulējošie fiksatori fiksē paraugu, strauji mainot šūnu sastāvdaļu hidratācijas stāvokli. Šajā procesā olbaltumvielas tiek koagulētas vai izdalītas ārpus šūnas. Koagulējošos fiksatorus izmanto biežāk, jo tie ir viegli reproducējami un daži no tiem tiek pievienoti citu fiksatoru sagatavošanas posmā. Lielākā problēma, izmantojot koagulējošos fiksatorus, ir parauga saraušanās risks (Held, 2015). Piemēram, metanola izmantošana veicina parauga augstuma samazināšanos par 50%, kā rezultātā iegūtie 3D mērījumu dati var būt ne visai precīzi (Specht et al., 2017). Ideālā gadījumā jebkuram fiksatoram būtu jāpiesūcina paraugs samērā īsā laika sprīdī, jāfiksē visas šūnas struktūras un jāaglabā nemainīgs stāvoklis, apstrādājot paraugu ar citiem ķīmiskiem reaģentiem. Tomēr, neviens no zināmiem fiksatoriem nav kļuvis par ideālu un katru reizi ir jāveic vairāki eksperimenti, nosakot piemērotāko ķīmisko fiksatoru un laiku fiksatora iekļūšanai objekta šūnās (Bacallao & Stelzer, 1989, Pawley, 2006). Tālāk uzskaitīti biežāk lietotie ķīmiskie fiksatori helmintoloģijā.

- Etanols 70%, 96%, 96,6%. Visi uz spirtu bāzētie fiksatori ir denaturējošie fiksatori. Spirta klātbūtne izraisa proteīnu denaturāciju, atdalot ūdeni no proteīnu brīvajām karboksil, hidroksil, amino, amidino un imīno grupām, kā rezultātā notiek proteīnu koagulācija un audu saraušanās. Etanols nav piemērots lipīdu un ogļhidrātu fiksācijai, bet to izmanto glikogēna fiksācijai (Baker 1958; Howat & Wilson, 2014). Etanola kvalitāte ir būtiska, tas nevar būt denaturēts. Absolūtais etanols (100%) tiek atšķaidīts

ar destilētu ūdeni, iegūstot vajadzīgās koncentrācijas etanolu. Etanolā fiksētos paraugus ir ieteicams glabāt ledusskapī +4°C temperatūrā (Tkach et al., 2019), vai saldētavā -20°C temperatūrā ilgākai paraugu uzglabāšanai (Baines et al., 2015; Crawley et al., 2016). Paraugu fiksēšana etanolā tiek ieteikta šādu iemeslu dēļ: tiek iegūts kvalitatīvs paraugs morfoloģiskām analīzēm; fiksators ir pieejams lielākajā daļu valstu; piemīt zema toksicitāte (salīdzinājumā ar formalīnu, etanols ir mazāk kaitīgs paraugiem) un nav vajadzīga īpaša apmācība tā lietošanai; zemas izmaksas. Turklāt, etanols ir piemērots gan digeneju, gan nematodu parazītu sugu fiksēšanai (Justine et al., 2007, 2010, 2012).

- Formalīna – etanola (AFA) šķīdums. Van Cleave (1953) rekomendēta fiksēšanas metode ar formalīna-etanola šķīdumu ir piemērota monogineju un digineju fiksēšanai. Minimālais paraugu fiksēšanas laiks ir atkarīgs no paraugu lieluma, pārsvarā tā ilgst 1 h 5 min lieliem paraugiem, tomēr nav tikusi novērota nelabvēlīga ietekme uz helminta parauga morfoloģiju, ja tas tika fiksēts ilgāku laiku. Fiksators ir piemērojams paraugiem, kuri vēlāk tiek krāsoti un analizēti ar kādu no mikroskopijas metodēm (Chubb, 1962; Cribb & Bray 2010).
- Karnoja šķīdums. Karnoja fiksatora pagatavošanas procesā tiek izmantots hloroforms un ledus etiķskābe, kas novērš etanola izraisīto audu saraušanos un nodrošina paraugu fiksāciju ar ūdeņraža saistīšanos pie audu struktūrām (Howat & Wilson, 2014). Karnoja fiksators ir piemērots trematodes (Laxmaredy & Benarjee, 2013) un nematodes parazītu fiksēšanai (Porta-de-la-Riva et al., 2012).
- Bouina šķīdums. Bouina fiksatora pagatavošanas procesā tiek izmantota pikrīnskābe, ledus etiķskābe un formaldehīds, lai gan formaldehīda vietā gandrīz vienmēr tiek izmantots formalīns, kas ir 37% formaldehīda šķīdums ūdenī. Pikrīnskābes iekļūšana audos ir lēna, koagulējot proteīnus. Savukārt, etiķskābes iekļūšana audos notiek salīdzinoši ātri, novēršot pikrīnskābes izraisīto audu saraušanos (Fox et al., 1985; Bacallao et al., 2006). Fiksators ir piemērots dažādu helmintu sugu fiksēšanai (Bamidele 2007).
- 10% neitrāli buferēts formalīns. Fiksators tiek iegūts, šķīdinot 4% formaldehīdu neitrāli buferētā šķīdumā (Howat & Wilson, 2014). Formalīns ātri iekļūst šūnā, pārveidojot proteīnu struktūru, jo tas veido sānu ķēdes ar aminoskābēm. Fiksators ir piemērots monogineju (Kritsky & Bakenhaster, 2011), digineju (Cribb & Bray, 2010) un nematodes fiksēšanai (Moravec & Justine, 2005).

1.3. Vispārīgs helmintu raksturojums

Pasaule ir pakļauta nozīmīgām apkārtējās vides izmaiņām, kas ir saistītas ar cilvēka aktivitātēm un to ietekmi uz ekoloģiju. Dzīvotnes modifikācijas ir vienas no tām izmaiņās, kas var mainīt bioloģiskās sistēmas, mainot epidemioloģisko un epizootoloģisko vidi (Daily & Ehrlich, 1996; Acevedo-Whitehouse & Duffus, 2009; Zarlenga, 2020). Pētnieki vairākkārt ir mēģinājuši sasaistīt specifiskas saimnieku pazīmes ar helmintu sugu daudzveidību, tomēr iegūtie rezultāti ir pretrunīgi (Arneberg, 2002; Bordes et al., 2007, 2008, 2009, 2010). Ir veikti plaši pētījumi par helmintu sugu daudzveidības noteicošiem faktoriem starp zīdītāju sugām (Morand & Poulin, 1998; Bordes et al., 2009, 2010), tomēr tikai daži pētījumi koncentrējas uz grauzējiem, rāpuļiem vai putniem (Feliu et al., 1997; Bordes et al., 2007).

Helminti izraisa vairākas postošas slimības ne tikai cilvēkam, bet arī dzīvniekiem un augiem. Ar augsni pārnestie helminti izraisa tropiskās slimības, kas ietekmē vairāk kā 1 miljardu cilvēku visā pasaulē (Bethony et al., 2006), asins sūcēji-parazīti (šistosomas) invadē vairāk kā 200 miljonu cilvēku (Steinmann et al., 2006) un vairākos miljonos cilvēku dzīvo lentes (Budke et al., 2009). Helminti var izraisīt ne tikai invaliditāti un nāvi, bet arī izraisīt slimības, kas apdraud pārtikas drošību. Mājlopu invadēšanās ar lenteņu kāpuriem (ehinokokoze) izraisa vairāk kā 2 miljardu zaudējumus tikai Amerikas Savienoto Valstu (ASV) lopu audzētavās (Torgerson & Macpherson, 2011) un parazitiskās augu nematodes ik gadu rada vairāk 80 miljardu ASV dolāru zaudējumus (Nicol et al., 2011). Charlier et al. (2020), iesaistot 18 Eiropas valstis, aprēķināja ekonomisko slogu, ko atgremotāju lopkopībai rada gremošanas sistēmu nematodes, *Fasciola hepatica* un *Dictyocaulus viviparus*. Pēc viņu aprēķiniem šo trīs grupu helminti ik gadu rada 1,8 miljardu izmaksas, no kuriem 81% rodas zaudētās produkcijas dēļ un 19% tiek tērēti dzīvnieku ārstēšanai (Charlier et al., 2020).

Helmintus pārstāv dažādas organismu formas gan brīvi dzīvojošas, gan parazitiskas. No visiem zināmiem helmintiem, lielākā daļa pieder vai nu pie plakantārpiem jeb Platyhelminthes Minot 1876 vai pie velteniskajiem tārpiem jeb Nematoda Diesing, 1861 (Nemathelminthes tips) (Castro 1996). Plakantārpu un Nematoda salīdzinājums apkopts 2. tabulā.

Plakantārpu un Nematoda vispārējs salīdzinājums (pēc Castro 1996)

Plakantārpi	Nematoda
Helmintiem ir plakanas formas ķermenis	Helmintiem ir cilindriskas formas ķermenis
Nav pilnībā attīstījusies gremošanas sistēma (nav mutes, nav kuņģa), daļai parazitāru vispār nav gremošanas sistēmas	Ir attīstīta vienkārša gremošanas sistēma, mute
Kutikula lielākoties parazitiskajām formām, bieži ir skropstiņas	Ķermeni apņem ārējais apvalks saukts par kutikulu
Elpošana notiek ar ķermeņa virsmu (vienkāršā difūzija)	Nav elpošanas sistēmas
Nav asinsrites sistēmas	Nav asinsrites sistēmas
Aseksuāla vairošanās: reģenerācija vai dalīšanās; lielākoties hermafrodīti	Parasti šķirtdzimuma, dēj olas, retāk dzīvdzemdētājas

Plakantārpu tips ir vairāk zināms obligāto parazitāru dēļ, ko ietver Neodermata superklase, iekļaujot monogejas, trematodes un cestodes (Ehlers, 1985; Rohde, 1996; Corrales et al., 2021), kas ir atbildīgi par ievērojamu slimību slogu kā mājlopiem, tā arī cilvēkiem (Smith et al., 1986; Halton, 1997; Tyler and Tyler, 1997; Littlewood et al., 1999; Charlier et al., 2020; Corrales et al., 2021). Tips kopumā parāda lielo morfoloģijas, dzīvotņu, biogeogrāfijas un vēsturiskās stratēģijas daudzveidību (Littlewood et al., 1999). Brīvi dzīvojošas formas, sauktas par tubelārijām - skropstiņtārpiem, lielā mērā apdzīvo jūras vai saldūdens dzīvotnes, tomēr, daži taksoni spēj apdzīvot siltus un mitrus sauszemes biotopus (Ax, 1985; Ehlers 1985). Plakantārpu klasifikācija ir atspoguļota 1. attēlā.

Acoelomorpha Ehlers, 1965
Nemertodermatida Karling, 1940
Acoela Uljanin, 1870
Platyhelminthes Minot, 1876
Catenulida Graff, 1905
Rhabditophora Ehlers, 1985
Macrostromorpha Doe, 1986
Haplopharyngida Karling, 1974
Macrostomida Karling, 1940
Trepaxonemata Ehlers, 1984
Polycladida Lang, 1881
Neophora Wetblad, 1948
“Lecithoepitheliata” Resisinger, 1924
Proseriata Meixner, 1938
Eulecithophora de Beauchamp, 1961
Rhabdocoela Meixner, 1925
Kalyptorhynchia Graff, 1905
“Dalyellioida” Bresslau, 1933
“Typhloplanoida” Bresslau, 1933
Temnocephalida Blanchard, 1849
Adiaphandia Noren & Jondelius, 2002
Prolecithophora Karling, 1940
Tricladida Lang, 1884
Maricola Hallez, 1892
Cavernicola Sluys, 1990
Continenticola Camanza, Littlewood, Clough,
Ruiz-Trillo, Baguna & Riutort, 1998
Neodermata Ehlers, 1985
Monogenea: Polyopisthocotylea +
Monopisthocotylea
Cestoda: Gyrocotylidea, Amphilinidea +
Eucestoda
Trematoda: Aspidogastrea + Digenea

1.attēls. Plakantārpu klasifikācija (pēc Norena et al., 2015)

1.3.1.Trematoda klase

Sistemātika aprakstīta, balstoties uz <https://fauna-eu.org/cdm> datiem.

Tips: Plakantārpi Minot, 1876
Apakštips: Rhabditophora Ehlers, 1985
Superklase: Neodermata Ehlers, 1985
Klase: Trematoda Rudolphi, 1808
Apakšklase: Digenea Carus, 1863
Apakšklase: Aspidogastrea Faust & Tang, 1936

Trematodes ietver dažādu grupu parazītus, kas invadē gan cilvēkus, gan dzīvniekus visā pasaulē (de Waal & Mehmood, 2021). Trematodes klasē ir vairāk kā 23000 sugu. Epidemioloģiskās un epizootoloģiskās pazīmes, kas ietver ģeogrāfisko izplatību, slimības prevalenci un intensitāti, transmisijas veidu un invadēšanās avotu(s),

u.c. ir ļoti mainīgi un atkarīgi no katras konkrētās trematodes sugas (Chai et al., 2014a,b).

Trematodes sugas, kuras izraisa cilvēku saslimšanu, var iedalīt sešās lielās grupās atkarībā no to dzīvotnes definitīvajā saimniekā: asins parazīti, aknu parazīti, plaušu parazīti, rīkles parazīti, aizkuņģa parazīti un zarnu parazīti (Toledo & Fried, 2019). Piemēram, fascioloze ir pārtiku bojājoša zoonozes slimība, ko izraisa *Fasciola* ģints trematodes, no kurām *Fasciola hepatica* ir ģeogrāfiski visizplatītākā suga (González-Miguel et al., 2019). Pārtiku bojājošas trematodes invadē vairāk kā 294 miljonu cilvēku visā pasaulē (Bennett & Robinson, 2021). Tā kā lielākā daļa izraisīto slimību ir endēmiskas pasaules nabadzīgāko valstu reģionos, tad Pasaules Veselības Organizācija tās ir nosaukusi par novārtā atstātām tropiskām slimībām (*World Health Organization*, 2022). Fascioloze rada ekonomiskus zaudējumus lauksaimniecībā un dzīvnieku fermu īpašniekiem aptuveni 2 miljardu ASV dolāru apmērā viena gada laikā (Mehmood et al., 2017).

1.3.1.1. *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* Ejsmont, 1932

Sistemātika aprakstīta, balstoties uz <https://fauna-eu.org/cdm> datiem.

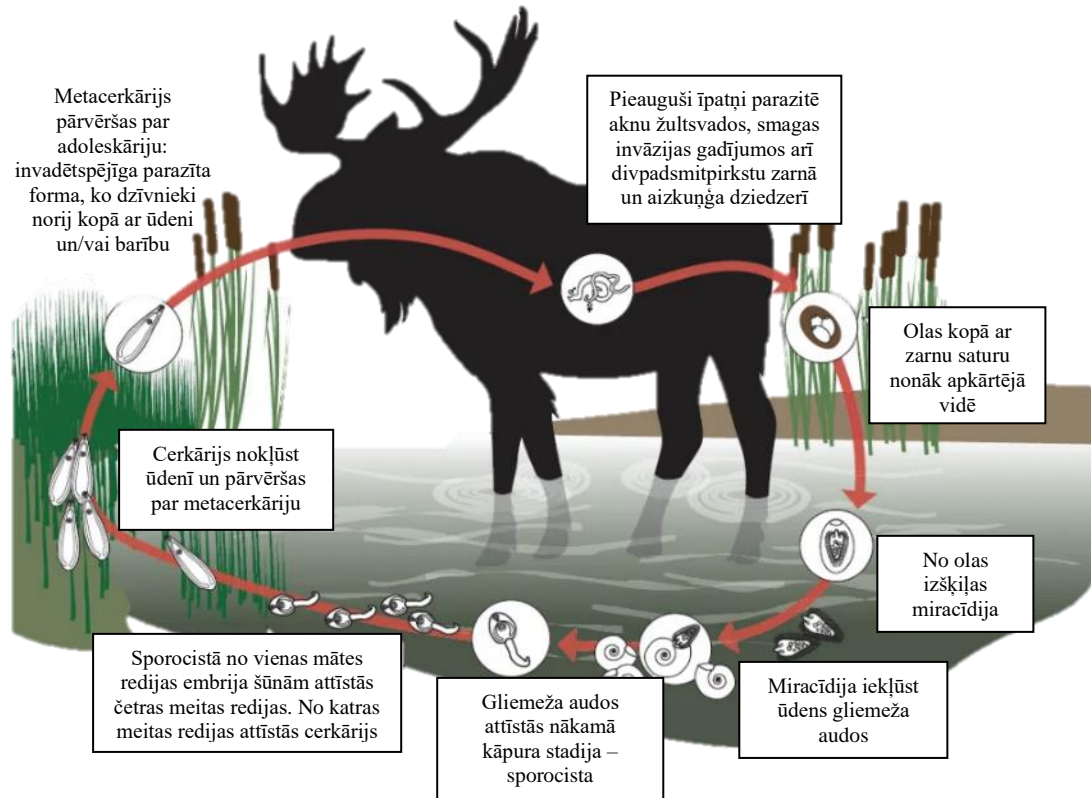
Tips:	Plakantārpi Minot, 1876
Apakštips:	Rhabditophora Ehlers, 1985
Superklase:	Neodermata Ehlers, 1985
Klase:	Trematoda Rudolphi, 1808
Apakšklase:	Digenea Carus, 1863
Kārta:	Plagiorchiida Lühe, 1901
Apakškārta:	Echinostomata Looss, 1902
Dzimta:	Fasciolidae Railliet, 1895
Ģints:	<i>Parafasciolopsis</i> Ejsmont, 1932

Alnis (*Alces alces*) ir *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Ejsmont, 1932) dabiskais saimnieks (Filip, 2016). Aknu parazīts ir parafasciolopsozes izraisītājs (Rikovski, 1955; Lachowicz, 1987; Filip-Hutsch et al., 2019). Aļņu aknu parazīts pirmo reizi tika novērots 1932. gadā Austrumeiropā. Mūsdienās parazīts ticis atrasts Eiropas stirnās (*Capreolus capreolus*) Polijā (Filip et al., 2016) un aļņos Baltkrievijā (Polaz et al., 2017), Latvijā (Bergmane et al., 2017, 2019), Krievijas ziemeļrietumos (Samojlovskaja, 2008) un Polijā (Filip & Demiaszkiewicz, 2016), staltbriežos (*Cervus elaphus*) Ungārijā (Majoras et al., 2000) un Baltkrievijā, kā arī sumbros jeb Eiropas bizonos (*Bison bonasus*) Baltkrievijā (Polaz et al., 2017).

Pētījumos ticis noskaidrots, ka *P. fasciolaemorpha* ietekmē aļņu mirstību, jo lielāka invāzija saimnieka organismā noved pie saimnieka veselības stāvokļa

pasliktināšanās un pastāv lielāka iespēja, ka to nomedīs plēsēji (Rikovski, 1955; Lachowicz, 1987; Filip et al., 2016; Filip-Hutsch et al., 2019).

P. fasciolaemorpha attīstības cikls atspoguļots 2. attēlā.



2. attēls *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* attīstības cikls (pēc Keidāne et al., 2017)

1.3.1.2. *Diplodiscus subclaviatus* (Pallas, 1760)

Sistemātika aprakstīta, balstoties uz <https://fauna-eu.org/cdm> datiem.

Tips:	Plakantārpi Minot, 1876
Apakštips:	Rhabditophora Ehlers, 1985
Superklase:	Neodermata Ehlers, 1985
Klase:	Trematoda Rudolphi, 1808
Apakšklase:	Digenea Carus, 1863
Kārta:	Plagiorchiida La Rue, 1957
Apakškārta:	Pronocephalata Skrjabin, 1955
Dzimta:	Diplodiscidae Cohn, 1904
Ģints:	<i>Diplodiscus</i> Diesing, 1836

Sugas dabiskais saimnieks ir abinieki (Vojtkova, 1990; Vojtkova & Roca, 1993; Chikhlyayev et al., 2012a,b; Kuzmin, 2012). Kosmopolīta izplatība (Chikhlyayev et al., 2018), ir plaši izplatīts Eiropā (Krupenko, 2014). Līdz šim nav ziņots, ka parazīts savam saimniekam izraisītu bīstamu slimību.

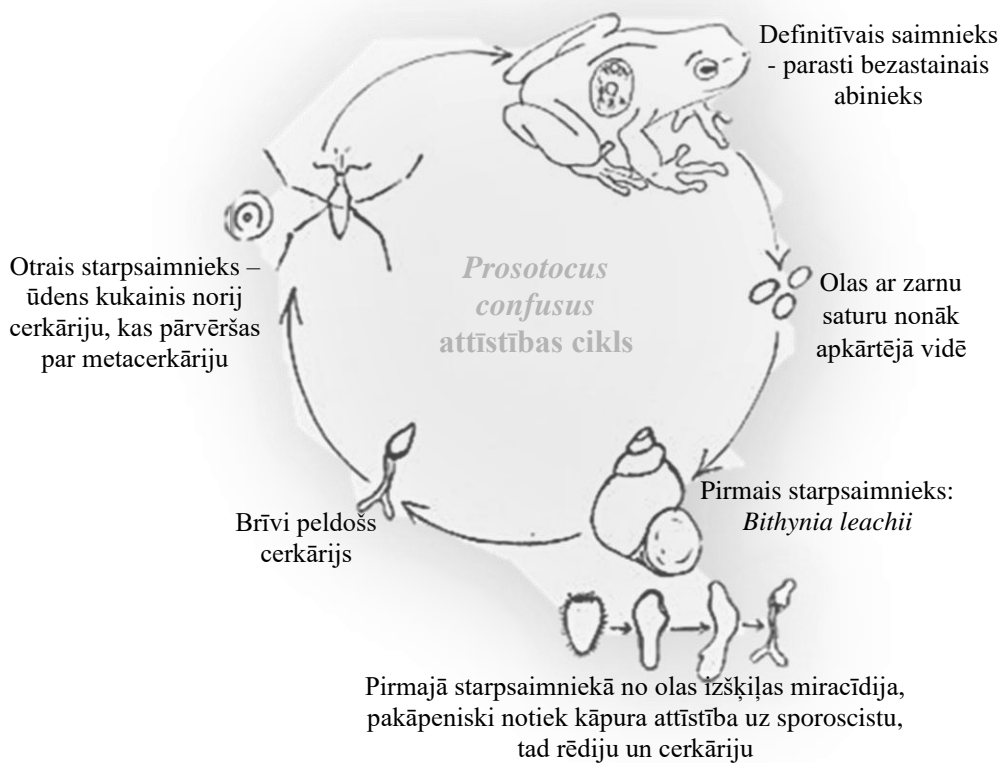
Attīstības cikls saistīts ar saimnieku maiņu. Starpsaimnieks visbiežāk ir ūdensspolišu dzimtas gliemeži, retāk *Anisus*, *Viviparus* un *Segmentina* dzimtas pārstāvji (Skrjabin, 1949). Definitīvie saimnieki: *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882), *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) u. c. (Chikhlyayev et al., 2018; Rubenina et al., 2021).

1.3.1.3. *Prosotocus confusus* (Looss, 1894)

Sistemātika aprakstīta, balstoties uz <https://fauna-eu.org/cdm> datiem.

Tips:	Plakantārpi Minot, 1876
Apakštips:	Rhabditophora Ehlers, 1985
Superklase:	Neodermata Ehlers, 1985
Klase:	Trematoda Rudolphi, 1808
Apakšklase:	Digenea Carus, 1863
Kārta:	Plagiorchiida La Rue, 1957
Superdzimta:	Plagiorchiidae Lühe, 1901
Dzimta:	Lecithodendriidae Lühe, 1901
Ģints:	<i>Prosotocus</i> Looss, 1899

Sugas dabiskais saimnieks ir abinieks, tomēr dažos pētījumos parazīts tika izolēts no rāpuļa, vienu reizi no sikspārņa (Skrjabin & Antipin, 1962), un no zivs. Visticamākais, ka visos šajos gadījumos parazīts nejauši ticis norīts kopā ar barību (Lotz & Font, 2008). *P. confusus* ir izplatīts Palearktiskas reģionā. Līdz šim nav ziņots par parazīta kaitīgo ietekmi uz saimnieka organismu. *P. confusus* ir sarežģīts attīstības cikls ar saimnieku maiņu. Attīstības cikls ir atspoguļots 3. attēlā.



3. attēls. *Prosotocus confusus* attīstības cikls (Rubeniņa, 2022)

1.3.1.4. *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819)

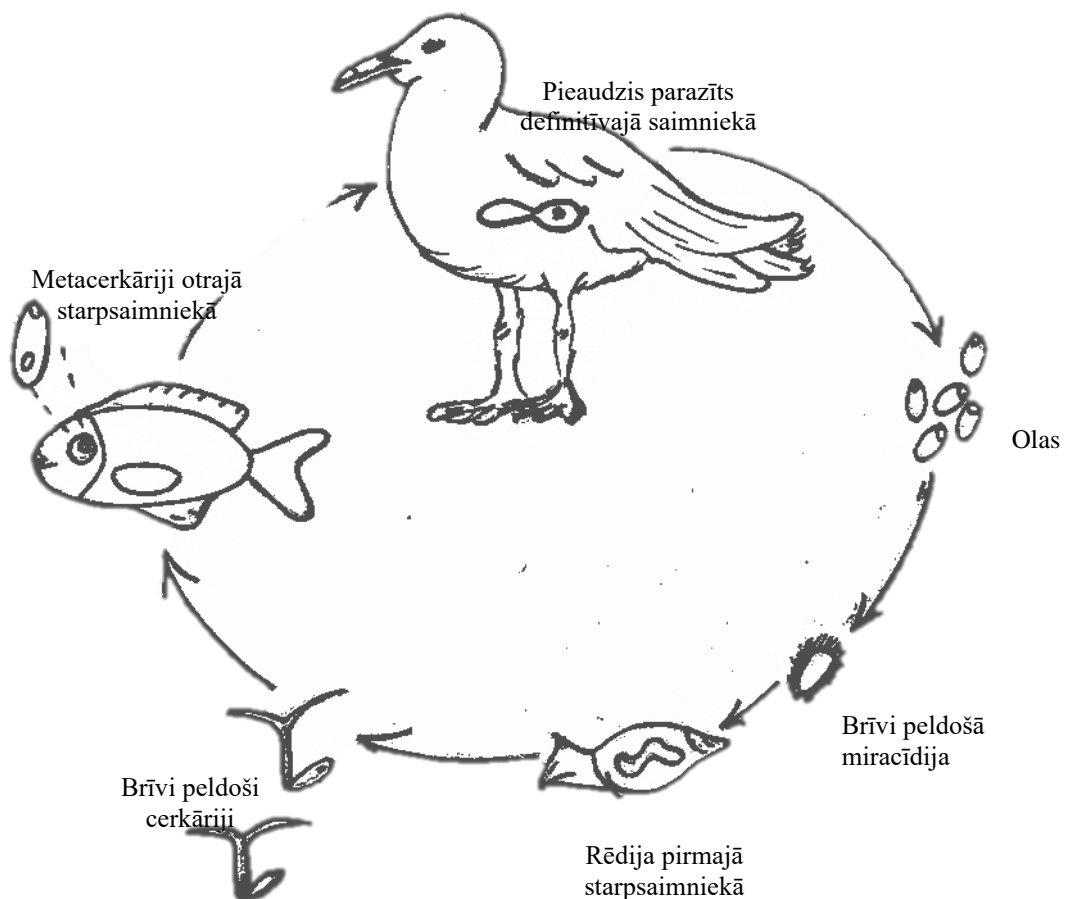
Sistemātika aprakstīta, balstoties uz <https://fauna-eu.org/cdm> datiem.

Tips:	Plakantārpi Minot, 1876
Apakštips:	Rhabditophora Ehlers, 1985
Superklase:	Neodermata Ehlers, 1985
Klase:	Trematoda Rudolphi, 1808
Apakšklase:	Digenea Carus, 1863
Kārta:	Diplostomida Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003
Superdzimta:	Diplostomoidea Poirier, 1886
Dzimta:	Diplostomidae Poirier, 1886
Ģints:	<i>Diplostomum</i> Nordmann, 1832

Dabiskais saimnieks ir zivis, galvenokārt, saldūdens zivju sugas. Izplatīts Eiropā, Āzijā un Ziemeļamerikā (Grabda, 1991; Briede & Kirjušina, 2018).

Diplostomozes slimības ierosinātājs. Tā kā visuzņēmīgākās ir lašu dzimtas zivis, tad slimība tiek raksturota kā ekonomiski nozīmīga akvakultūrā (Sweeting, 1974).

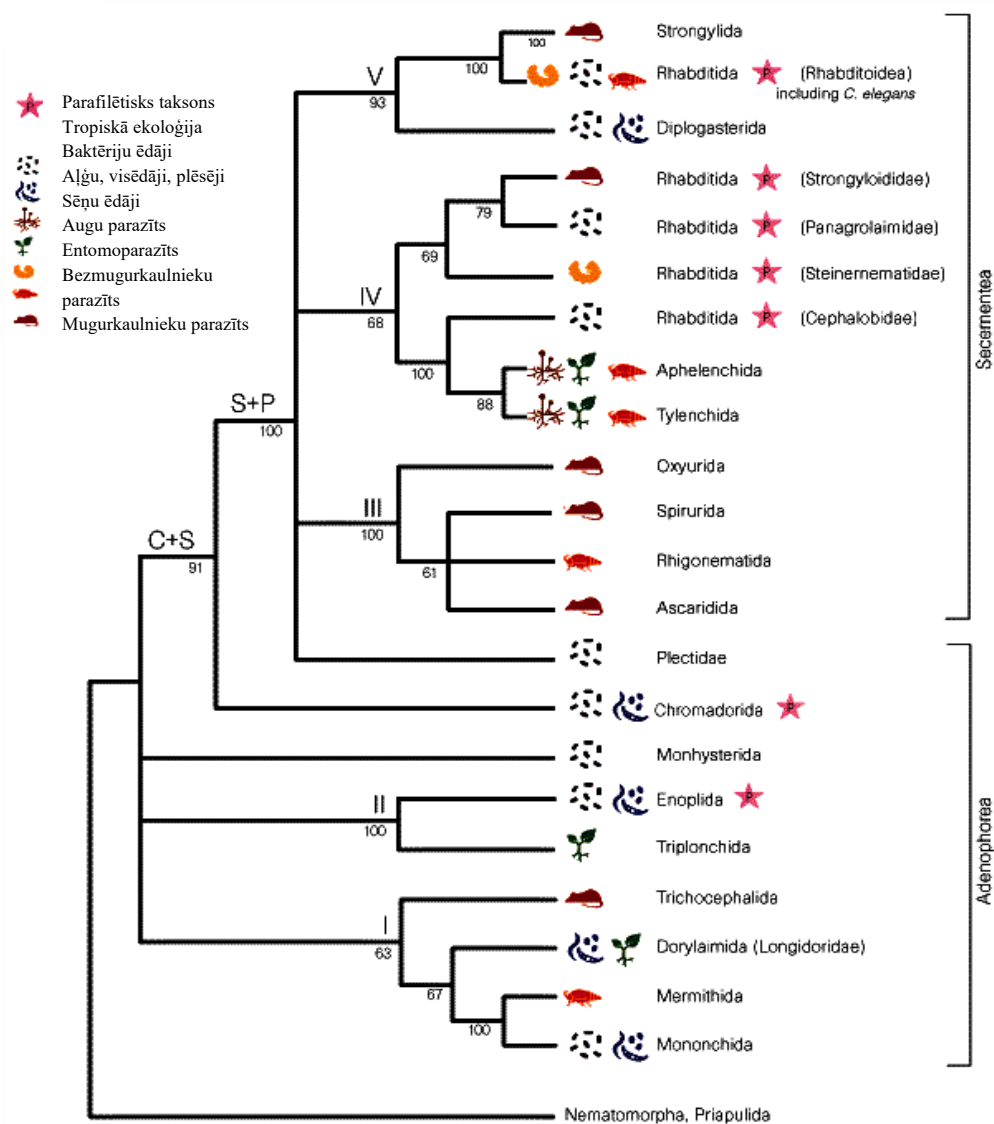
Attīstības cikls ietver divus starpsaimniekus (Behrmann-Godel & Brinker, 2016). Attīstības cikls ir atspoguļots 4. attēlā.



4. attēls. *Diplostomum spathaceum* attīstības cikls (Rubeniņa, 2022)

1.3.2. Tips Nematoda

Nematoda ir bioloģiski daudzveidīgs dzīvnieku tips un ir izplatīts visā pasaulē, pielāgojoties visdažādākajiem apkārtējās vides apstākļiem. Vairākos jūras un sauszemes nogulumos indivīdu skaita ziņā vislielāko grupu pārstāv Nematoda (Platonova & Galtsova, 1976; Blaxter & Koutsovoulos, 2015). Nematoda tipa helmintus var iedalīt divās lielās kategorijās: barošanās (mikrobotrofiski, plēsīgi vai parazitiski augos, bezmugurkaulniekos vai mugurkaulniekos) vai ekoloģija (augsnē, jūrās, saldūdens, ectoparazīti, endoparazīti vai brīvi dzīvojoši) (Mukaratirwa et al., 2013) (skat. 5. attēlu). Nav zināms konkrēts sugu skaits, bet sugu līmeņa daudzveidība varētu būt ap 1 miljonu vai pat vairāk. Viens no iemesliem kāpēc tipā esošās sugas nav izpētītas pilnā mērā ir tas, ka paraugu iegūšana nav tik vienkārša - paraugs ir jāizdala no saimnieka un jāidentificē (Poinar 2010).



5. attēls. Nematoda tipa dendrogramma, balstoties uz SSU-sekvences datu kopu (pēc Blaxter 1998)

Pastāv uzskats, ka jebkurā laika posmā viena ceturtdaļa līdz viena trešdaļa cilvēku populācijas esot invadējusies ar nematoda parazītu (Dobson et al., 2008). Aprēķini par parazītiskās nematodes sugu skaitu uz vienu saimniekorganismu liecina, ka uz mugurkaulniekiem vien ir aptuveni >28 000 nematodu parazītu, no kuriem lielākā daļa paliek neaprašīti (Kiontke et al., 2021). Šī iemesla dēļ nematodes ir nozīmīgākie augu un dzīvnieku populācijas skaita regulatori. Turklāt, neskaitāmus augus un dzīvniekus var izmantot vairāk kā viena parazītiskā nematode (Blaxter & Koutsovoulos, 2015).

Trichinella ģintī ir zināmi 12 taksoni, kas lielākoties tikuši identificēti balstoties uz molekulārās bioloģijas metodēm, jo nav definētas morfoloģiskās īpašības, kas savā starpā atšķirtu sugu kāpurus (Pozio & Zarlenga, 2013; Zarlenga et al., 2020). Vispārējais

Trichinella ģints raksturojums, iekļaujot sugas, to izplatību, ciklu un dabiskos saimniekus, ir apkopots 3. tabulā.

3. tabula

Trichinella ģints sugu vispārējais raksturojums

<i>Trichinella</i> suga vai genotips	Izplatība	Cikls	Dabiskie saimnieki	Atsauce
Kapsulu veidojošais zars - zarā ir identificētas piecas sugas un četri genotipi				
<i>T. spiralis</i>	Kosmopolītiska	Mājas un savvaļas	Cūkas, žurkas, reti gaļēdāji	Gamble et al., 2000; Kapel, 2001; La Rosa et al., 2003a; Malakauskas et al., 2007; Pozio, 2007b; Bilska-Zajac et al., 2021
<i>T. nativa</i>	Holarktiskā reģiona Artikas un antarktīdas apgabali	Savvaļas	Sauszemes un jūras gaļēdāji	Zarlenga et al., 1999; Dick & Pozio, 2001; Kapel, 2000; Malakauskas & Kapel, 2003; Pozio & Zarlenga, 2005
<i>T. britovi</i>	Mērenās joslas Palearktiskas apgabali, ziemeļ un Rietumāfrika	Savvaļas	Reti mājas gaļēdāji, reti cūkas	Zarlenga et al., 1999; Pozio & Zarlenga, 2005; Pozio & Murrell, 2006; Pozio et al., 2006, 2009
<i>T. murrelli</i>	Neartikas apgabala mērenās joslas	Savvaļas	Gaļēdāji	Ancelle et al., 1988; Pozio & La Rosa, 2000; Kapel & Gamble, 2000; Kapel, 2001
<i>T. nelsoni</i>	Etiopijas apgabals	Savvaļas	Gaļēdāji, reti cūkas	Pozio et al., 1997b; Pozio & Murrell, 2006; Pozio, 2007b; Marucci et al., 2009
<i>Trichinella</i> T6	Kanāda un ASV	Savvaļas	Gaļēdāji	Zarlenga et al., 1999; La Rosa et al., 2003a; Pozio & Murrell, 2006; Krivokapich et al., 2008
<i>Trichinella</i> T8	Dienvidāfrika un Namībija	Savvaļas	Gaļēdāji	Pozio et al., 1994; Pozio et al., 2005; Marucci et al., 2009
<i>Trichinella</i> T9	Japāna	Savvaļas	Gaļēdāji	Nagano et al., 1999; Zarlenga et al., 2006; Kanai et al., 2007
<i>Trichinella</i> T12	Argentīna	Savvaļas	Gaļēdāji	Krivokapich et al., 2008
Kapsulu neveidojošais zars - zarā ir identificētas trīs sugas				

<i>Trichinella</i> suga vai genotips	Izplatība	Cikls	Dabiskie saimnieki	Atsauce
<i>T. pseudospiralis</i>	Kosmopolītiska	Savvaļas	Reti mājas zīdītāji un putni	Dick, 1983; Zarlenga et al., 1996, 1999; Jongwutiwes et al., 1998; La Rosa et al., 2001; Pozio & Murrell, 2006
<i>T. papuae</i>	Papua jaungvineja, Taizeme	Savvaļas	Reti mājas cūkas, sāļūdens krokodili	Anonymous, 1964; Pozio et al., 1999a; Owen et al., 2000; Pozio et al., 2005b; Owen & Reid, 2007
<i>T. zimbabwensis</i>	Etiopija, Mozambika, Dienvidāfrika, Zimbabve	Savvaļas un mājas	Nīlas krokodili, Nīlas monitorķirza kas, lauvas	Pozio et al., 2002, 2004, 2007c; La Grange et al., 2009

Trichinella ģints ietver nematodes helmintus, kuri ir starp pasaules visizplatītākajiem zoonožu patogēniem un ir iekļauti top desmitniekā kā ekonomiski nozīmīga pārtikas izcelsmes slimība (*Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization*, 2020). *Trichinella*s ir sastopamas visā pasaulē, izņemot Antarktīdu, turklāt tās invadē gan mājas, gan savvaļas dzīvniekus (Pozio & Murrell, 2006; Kirjušina et al., 2015). Neskatoties uz cilvēku centieniem kontrolēt trihinelozu un zināmo faktu, ka tā ir gaļas izraisīta zoonoze, tā joprojām ir samērā bieži sastopama saslimšana vairākās pasaules valstīs (Murrell & Pozio, 2011, 2016).

1.3.2.1. *Trichinella spiralis* (Owen, 1835)

Sistemātika aprakstīta, balstoties uz <https://fauna-eu.org/cdm> datiem.

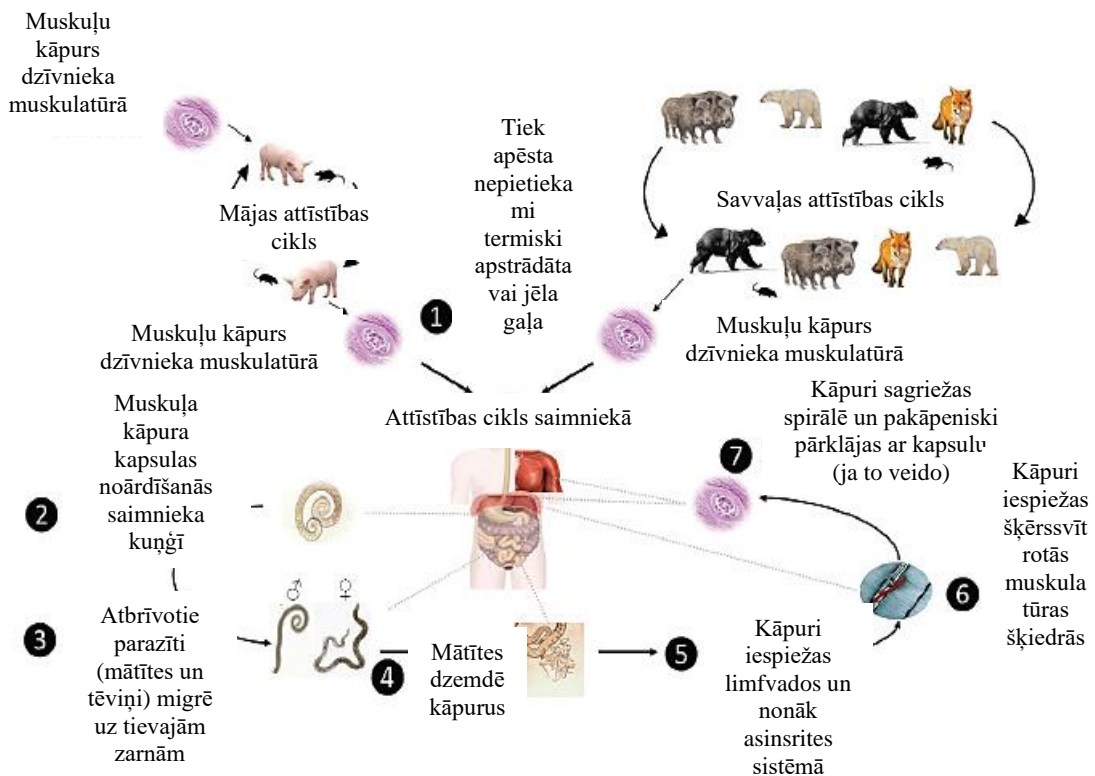
Tips:	Nematoda Rudolphi, 1808
Klase:	Adenophorea (von Linstow, 1905), Chitwood 1958
Kārta:	Enoplida Filipjev, 1929
Apakškārta:	Trichinellina Hodda 2007
Superdzimta:	Trichinelloidea Ward, 1907
Dzimta:	Trichinellidae Ward, 1907
Ģints:	<i>Trichinella</i> Railliet, 1895

T. spiralis dabiskie saimnieki ir meža cūkas, rudās lapsas, brūnie lāči, meža caunas, akmens caunas, pelēkie vilki, Eirāzijas lūši, Eirāzijas bebri u.c. (Pozio et al., 2007a; Deksne et al., 2016; Zarlenga, 2020; Bilaska-Zajac et al., 2021). *T. spiralis* ir viena no sugām, kas izraisa trihinelozu – parazītisku slimību, kas potenciāli rada nopietnu kaitējumu saimnieka veselībai (Hu et al., 2021). Starp visiem *Trichinella* ģints parazītiem *T. spiralis* suga visbiežāk izraisa cilvēku invadēšanos (Murrell & Pozio, 2011). Galvenais

invadēšanās avots ir mājas vai meža cūku nepietiekami termiski apstrādāta gaļa un gaļas izstrādājumi, kas satur parazīta kāpurus (Bilska-Zajac et al., 2021).

T. spiralis ir konstatēta visos kontinentos, izņemot Antarktīdu (Murrel & Pozio, 2011; Wang et al., 2018).

Trihineloze ir kļuvusi par galveno pārtiku bojājošo zoonozi, ietekmējot ne tikai endēmisko valstu, bet arī lielāko daļu valstu ekonomiku, sociālo stāvokli un sabiedrības veselību. Ierobežot dzīvnieku invadēšanos ar *Trichinella* ir grūti, jo parazītam ir daudz saimnieku un, iespējams, ka visi vēl nav zināmi (Hu et al., 2021). Trihinelas attīstības cikls ir atspoguļots 6. attēlā.



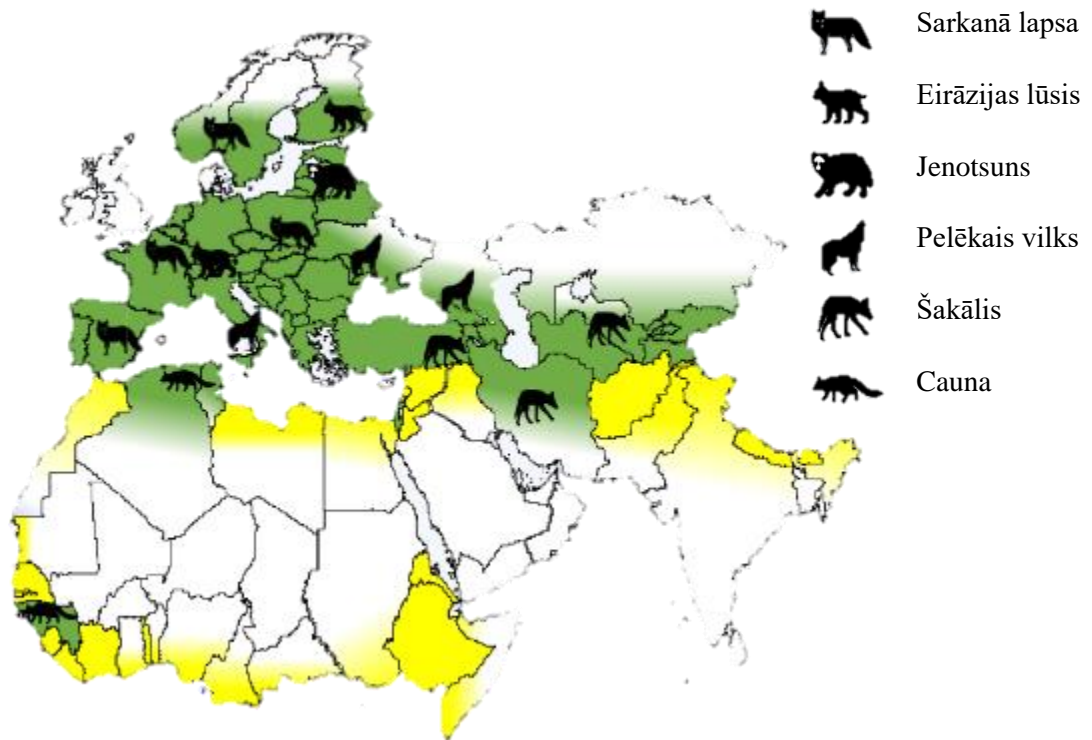
6. attēls. *Trichinella* spp. attīstības cikls (pēc Andrade-Becerra et al., 2017)

1.3.2.2. *Trichinella britovi* Pozio, La Rosa, Murrell & Lichtenfels, 1992

Sistemātika aprakstīta, balstoties uz <https://fauna-eu.org/cdm> datiem.

Tips:	Nematoda Rudolphi, 1808
Klase:	Adenophorea (von Linstow, 1905), Chitwood 1958
Kārta:	Enoplida Filipjev, 1929
Apakškārta:	Trichinellina Hodda 2007
Superdzimta:	Trichinelloidea Ward, 1907
Dzimta:	Trichinellidae Ward, 1907
Ģints:	<i>Trichinella</i> Railliet, 1895

T. britovi dabiskie saimnieki ir mājas cūka, meža cūka, brūnā žurka, mājas suns, mājas kaķis, Eirāzijas bebrs, meža plēsēji (Pozio et al., 2009a,b; Segliņa et al., 2015). Eiropas valstīs *T. britovi* ir visizplatītākais trihinelozes etioloģiskais aģents mājas un savvaļas dzīvniekos (Pozio 2007a; Pozio & La Rosa, 1998). *T. britovi* izplatība atspoguļota 7. attēlā.



- Reģioni, kur *T. britovi* tikusi dokumentēta mājas vai savvaļas dzīvniekos
- Reģioni, kur *T. britovi* nav tikusi dokumentēta, bet pastāv iespēja, ka varētu tikt atrasta
- Reģioni, kur *T. britovi* nekad nav tikusi dokumentēta un/vai nav piemērota dzīvotne

7. attēls *Trichinella britovi* izplatība (pēc Bruschi & Pozio, 2019)

1.4. Helmintu krāsošanas protokolu raksturojums

Sākoties mikroskopu attīstības vilnim 20. gadsimta vidū, paralēli sākās specifisku krāsošanas procedūru izstrāde, kam sekoja strauja informācijas plūsma par dažādu organismu uzbūvi un to specifiskām funkcijām (Halton 2004). Daudzu gadu garumā gaismas mikroskopijā tikuši izmantoti krāsošanas protokoli ar dabiskām krāsvielām, piemēram, karmīnu un safronu (Gillespie & Hawkey, 1995; Dapson, 2007). Krāsošana ar karmīnu dažādām parazītu sugām ir bijis kā viens no biežāk izmantotiem protokoliem un mūsdienās tas vēl aizvien tiek izmantots parazītu identificēšanai (Fakhar & Ghobaditara, 2016). Pēc tam sākās hematoksilīna un sintezēto anilīna krāsvielu ēra (Chung & Stewen,

1993). Vēlāk tika noskaidrots, ka karmīna krāsošana padara paraugus fluorescējošus un ir iespējams tos analizēt ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju (Lenzi et al., 1997; Machado-Silva et al., 1998; Krohne et al., 2003; Beckmann & Greweling, 2010). Helmintu krāsošanas procedūra ir būtiska precīzu datu ieguvei par specifiska parazīta morfoloģiju un struktūras izmaiņām (Beckmann & Greweling, 2010).

KLSM un fluorescentā aktīna krāsošanas protokols ir ticis izmantots vairāk kā 20 Digenea sugu muskuļu sistēmas rekonstrukcijai (Mair et al., 1998, 2000, 2003; Stewart et al. 2003a,b,c; Šebelova et al., 2004; Bulantovqa et al., 2011; Collins et al., 2011; Krupenko & Dobrovolskij, 2015; Petrov & Podvyznaya 2016; Krupenko & Dobrovolskij, 2018). Tomēr pētījumos aprakstītie standarta Trematoda krāsošanas protokoli prasa vairāk kā dienu (Krupenko, 2014) vai vairāk kā divas dienas paraugu sagatavošanai KLSM. Piemēram, Krupenko (2019) pētījumā aprakstītajā krāsošanas protokolā tika izmantots komerciāli pieejamais tetrametil-rodamīna izotiocianāts (TRITC) marķētais phalloidīns (Sigma, Vācija). TRITC marķētais phalloidīns konfokālās mikroskopijas pētījumos tiek izmantots aktīna mikrofilamentu identificēšanai. Ražotāju piedāvātajos standarta protokolā ir minēts, ka paraugiem jābūt fiksētiem formaldehidā (ThermoFisher, SigmaAldrich, 2022). Pētījumos aprakstīts (Krupenko, 2014; Krupenko & Dobrovolskij, 2015; Kremnev et al., 2020), ka parauga sagatavošana pēc standarta protokola prasa 8-24 stundu parauga inkubāciju TRITC marķētā phalloidīna šķīdumā. Kremnev et al. (2020, 2021) dažādu orgānu izpētei, ieskaitot nervus, muskulatūru, ekskretoro un reproduktīvo sistēmu, izmantojis standarta krāsošanas procedūru ar TRITC un 4', 6-diamidino-2-fenilindolu (DAPI). Inkubācija TRITC aizņēmusi 30-60 minūtes, tad krāsas skalošana aizņēmusi vēl 20-30 minūtes (Kremnev et al., 2020). Kopumā standarta krāsošanas protokols prasījis daudz resursu un darba stundu, bet mūsdienās priekšroka tiek dota efektīvām, bet ātrām procedūrām, iegūstot vēlamu rezultātu īsā laikā (Kirjusina et al., 2018).

Pētījumos aprakstītie krāsošanas protokoli *Trichinella* ģints kāpuriem nav vērsti uz paša kāpura izpēti, bet gan uz kādu specifisku proteīnu un tā lokalizācijas noteikšanu. Piemēram, Hernandez-Bello et al. (2008) izmantoja fluorescēna izotiocianātu (FITC), kāpura ķermenī nosakot Ts-CAV-1 proteīna atrašanās vietu. Golos et al. (2012) nepētīja *T. spiralis* uzbūvi, bet noteica timidilāta sintēzes proteīna lokalizēšanās vietas vai Li et al. (2020) interesēja tikai cisteīna proteāzes ATG4B uzkrāšanās vietas parazīta ķermenī. Tomēr ir būtiski izstrādāt krāsošanas protokolu, kas īsā laikā sniegtu detalizētu informāciju par specifiska parazīta uzbūvi. Precīzu aprakstu izveidošanai ir vajadzīga

ticama informācija par parazīta struktūru. Attīstoties mikroskopijas metodei, paralēli notiek jaunu luminoforu sintēze, kā rezultātā ir vajadzība pēc jauniem krāsošanas protokoliem vai esošo protokolu optimizācijas (Romani & Auwerx, 2021).

1.5. Konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas pielietojums bioloģijā

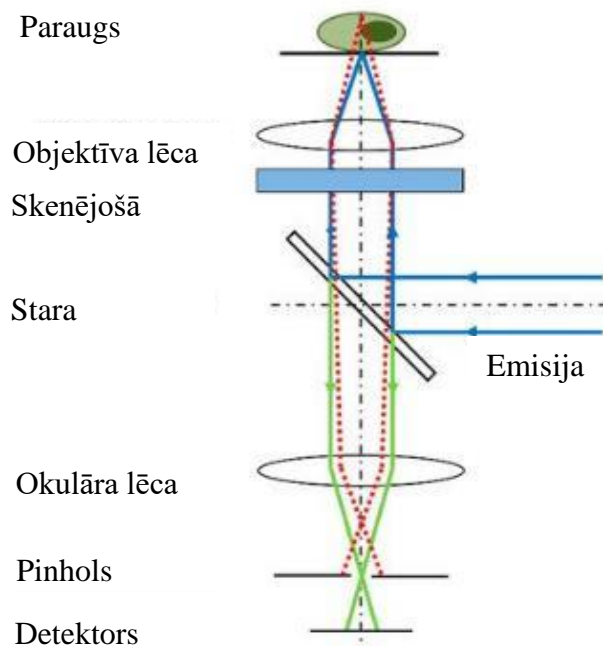
Helmintu identitāte līdz pat 17. gadsimtam bija tīta mītos un māņticībā. Tā laika ārsti uzskatīja, ka dienas parazīti veidojās no cilvēku ekskrementiem, līdzīgi kā kārpas un ēdes, bet, ja to atrada cilvēka ķermenī, tad tā esot radusies spontāni no netīšām apēsta brīvi dzīvojoša organisma. Tajā pašā laikā parādījās apraksti par aitu aknām, kurās tika atrasti trematodēm līdzīgi organismi. Toreiz cilvēki uzskatīja, ka tās ir no zemes veidojušās zivis vai dēles. Pagrieziena punkts bija 17. gadsimta otrā puse, kad Frančesko Redi un Antonijs van Lēvenhuks pirmo reizi parazitoloģijā sāka izmantot mikroskopu, tādējādi identificējot slimnieku zarnu parazītus un izveidojot helmintoloģijas zinātnisko lauku. Vēlāk 20. gadsimta vidū sekoja vēl lielāki atklājumi šūnu līmenī un jaunas metodes, izmantojot elektronisko optiku (Halton, 2004; Transidico et al., 2004; Hao et al., 2019).

KLSM ir zināma kā iespēja, kur var regulēt redzes lauka dziļumu, samazināt vai novērst fona ietekmi uz redzamo attēlu un veidot bieza parauga optiskā griezuma sērijas. Pasaule par KLSM dzirdēja ap 1950. gadu, kad ASV zinātnieks Marvins Lī Minski (no angļu val. *Marvin Lee Minsky*) bija izgudrojis KLSM darbības principus. Vēlāk 1961. gadā viņš patentēja pirmo konfokālo skenējošo mikroskopu. Šī izgudrojuma sākotnējais mērķis bija atrisināt problēmu blīvu audu izpētē, piemēram, smadzeņu izpēti, jo ar gaismas mikroskopiju tas bija gandrīz neiespējami (Cheng et al., 2019; Wang et al., 2019). Mūsdienās ar vairākiem tehnoloģiskiem uzlabojumiem, KLSM ir kļuvusi par vienu no spēcīgākajiem rīkiem bioloģisko organismu, audu un šūnu 3D strukturālos pētījumos. Metodes elastīguma dēļ mikroskopija tiek pielietota dažāda veida pētījumos, sākot ar organelļu izvietojumu šūnās līdz sīkākajiem audu morfoloģijas izmeklējumiem. KLSM ietvaros ir iespējams vizualizēt esošus procesus pat dzīvās šūnās (Groma & Zalcmane, 2012; Hao et al., 2019; Krmpot et al., 2019).

Plašāka konfokālās mikroskopijas izmantošana sākās 1980. gadu beigās, kad laboratorijās pamazām sāka parādīties pirmie konfokālie lāzerskenējošie mikroskopi un programmatūras. Pēc 1990. gada parādījās ar vien jaudīgāki un stabilāki lāzeri, skenēšanas spoguļi, optika un detektori. Laika gaitā KLSM kļūva par būtisku rīku bioloģiskajos pētījumos. Rezultātā ar KLSM tehniku ir iespējams uzņemt reālā laika

video, pētot gan metaboliskos, gan dinamiskos struktūras procesus šūnās, audos vai organismā (Wagner & Horn, 2017; Teng et al., 2020).

Kā jau norāda pats nosaukums, tad konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa lāzera gaismas kūlis ar skenēšanas galvanometra spoguļiem slīd pāri paraugam un reģistrē virsmas uzbūvi. Parasti lāzera stars tiek novirzīts uz skenējošo spoguļu pāri, kas slīd pāri paraugam vienā redzes laukā x un y virzienos, pēc tam stars pakāpeniski pārvietojas pa visu paraugu, veidojot optiskos griezumus. Lai iegūtu optiskā griezuma slāņus, lāzera fokusa punkts tiek mainīts uz jaunu optisko griezumumu un atkal tiek atkārtots skenēšanas process. Apkopojot visas optisko griezumus no parauga augšējās un apakšējās virsmas, var tikt rekonstruēts parauga 3D attēls. Papildus tam, ka ar KLSM var tikt iegūti divdimensiju optiskie griezumumi biežākiem paraugiem, tomēr, KLSM visbiežāk tiek izmantota 3D (x, y, z) vai četrdimensiju (x, y, z un t) attēlu iegūšanai ar spektrāliem detektoriem. Būtiskākās KLSM priekšrocības ir optisko griezumumu sēriju iegūšana, izšķirtspēja un 3D attēlu veidošana. Lielākā daļa konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu sistēmas nodrošina daudzkrāsainu attēlu iegūvi, spēju pielāgot pinhole izmēru, tādējādi iestatot optiskā griezuma slāņa biezumu un interesējošo reģionu (ROI) atlasī (Brown, 2007; Elliott, 2021; Guida et al., 2021). Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa darbības princips ir atspoguļots 8. attēlā.



8. attēls. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa darbības princips (pēc Schneckenburger et al., 2019; Guida et al., 2021)

Paraugu izpēte ar lāzeriem, veicina to fotoizbalēšanu, kas nozīmē, jo lielāka lāzera jauda tiek izmantota, jo mazāk laika atliek parauga detalizētai izmeklēšanai. Šī iemesla dēļ KLSM sagatavotie paraugi var tikt analizēti vien divas, maksimums trīs reizes. Ar katru izpētes reizi samazinās iegūto datu kvalitāte (Han et al., 2021).

Mikroskopiskie dati ir devuši atspērienu bioķīmiskajos, fizioloģiskajos un molekulārajos helmintu pētījumos un ir veicinājuši daudzus nozīmīgus atklājumus, ieskaitot atklājumus par parazītu izvairīšanos no saimnieka imūnsistēmas. Multidisciplinārā veidā mikroskopijas atklājumiem ir izdevies apvienot morfoloģu, bioķīmiķu, imunologu, fiziologu un molekulāro biologu intereses integrētā un funkcionāli dinamiskos pētījumos par helmintu parazītiem (Halton, 2004; Schneckenburger et al., 2019).

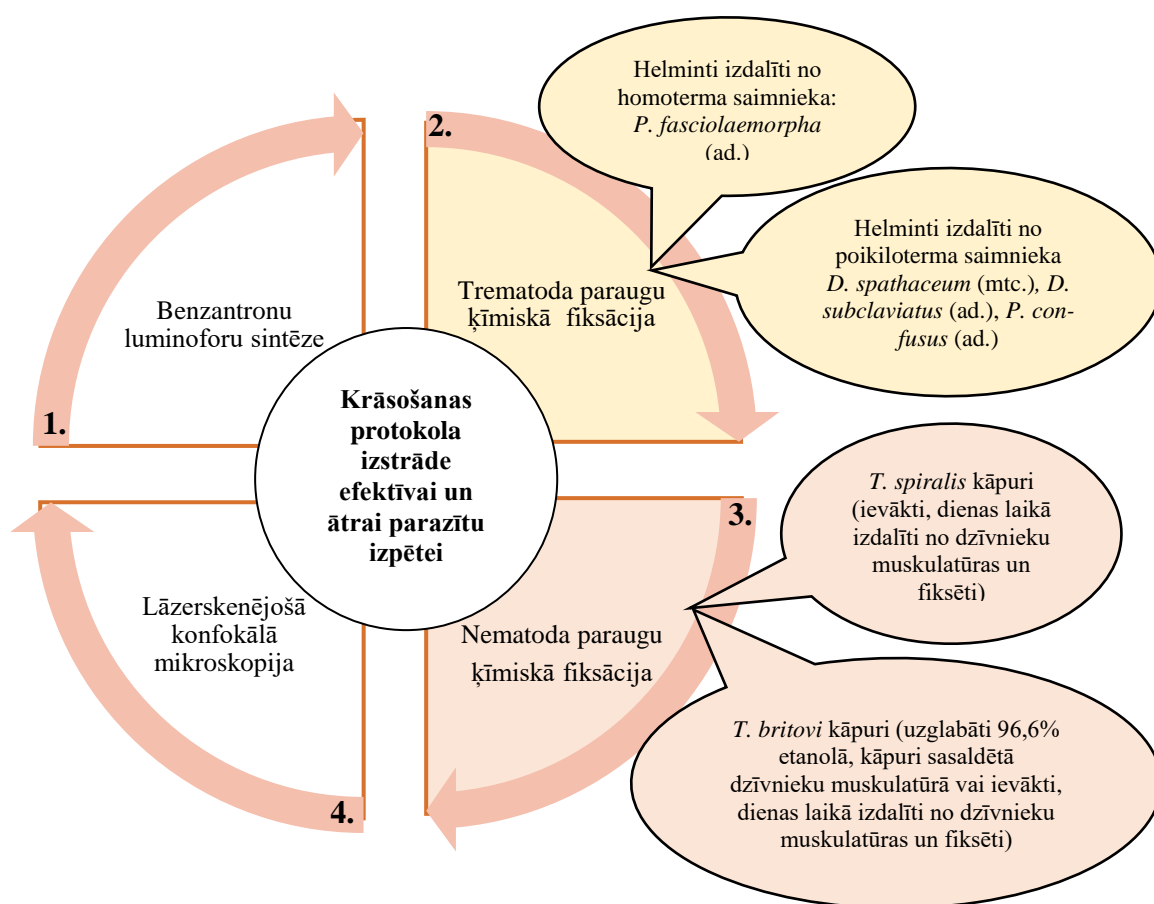
Parauga kopējais lielums ir saistīts ar to, cik biežus optiskos griezumus ir iespējams veikt. Lai gan KLSM var izmantot samērā lielus paraugus, iegūstot vairākas optisko griezumu sērijas, kuras pēc tam var salikt kopā ar programmatūras palīdzību, tomēr parauga biežums var būt limitējošs faktors. Turklāt, jo lielāks paraugs, jo vairāk optisko griezumu sēriju, jo lielāka varbūtība parādīties kādam artefaktam. Protams, plānojot lielu paraugu izmeklēšanu ar KLSM, ir jāņem vērā arī parauga skenēšanas ātrums. Viena optiskā griezuma slāni var noskenēt samērā ātri, bet, palielinot attēla izšķirtspēju un pārejot uz lielāku palielinājumu, skenēšanas ātrums samazinās. Līdz ar to ir jāreķinās, ka lielāku un biežāku paraugu skenēšana prasīs vairāk laika. Strādājot ar KLSM, ir svarīgi izvēlēties pareizo paraugu fiksatorus, fluorescējošos luminofoorus, cementējošās vielas paraugu sagatavošanai, tādējādi iegūstot optimālākos rezultātus (Ilie et al., 2019; Guida et al., 2021).

Mikroskopijas sasniegumi ir paplašinājuši cilvēku zināšanas helmintoloģijā, sniedzot fundamentāli svarīgu informāciju par helmintu galvenajām orgānu sistēmas struktūrām un to funkcijām (Halton, 2004).

2. MATERIĀLS UN METODEDES

Promocijas darba pētījums tika izstrādāts Daugavpils Universitātes (DU) (Latvija) Dzīvības Zinātņu un Tehnoloģiju Institūta (DZTI) Ekoloģijas Departamenta Parazitoloģijas un Histoloģijas laboratorijā laika posmā no 2017. gada līdz 2021. gadam.

Šajā nodaļā ir aprakstīti pētījumā izmantotie benzantronu luminofori, pētāmie paraugi un paraugu avots, kā arī sniegts apraksts par paraugu ķīmisko fiksēšanu un paraugu krāsošanu. Nodaļā sniegti apraksti par izstrādātajiem krāsošanas protokoliem un izmantotajām metodēm, kā arī krāsošanas protokolu aprobāciju pētījuma rezultātu iegūšanai. Pētījuma laikā tika izstrādāti krāsošanas protokoli trematodēm un trihinella parazītu kāpuru izpētei, trihinella kāpuru dzimumu noteikšanai, izmantojot specifiskus benzantrona luminoforus. Pētījuma dizains ir atspoguļots 9. attēlā.



9. attēls. Pētījuma dizains (Rubeniņa, 2017)

2.1. Benzantrona luminoforu sintēzes apraksts

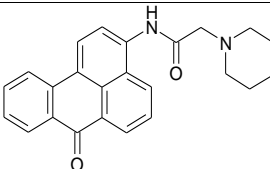
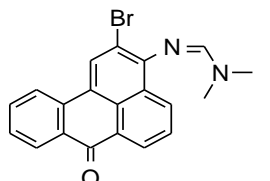
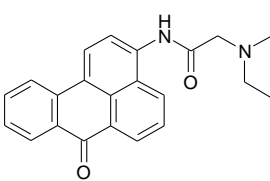
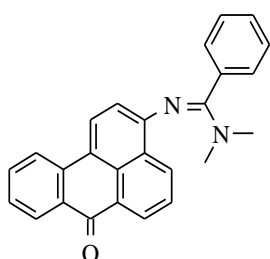
DU DZTI Lietišķās ķīmijas departamentā tika sintezēti benzantrona luminofori: AZPP, AM323, AZM, AM1, AM2, AM4, AM16, P8 un P13. Visi deviņi DU sintezētie benzantrona luminofori tika izmantoti bioloģisko objektu krāsošanā un specifisku

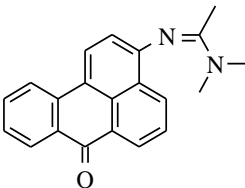
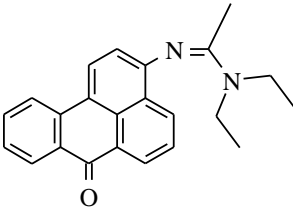
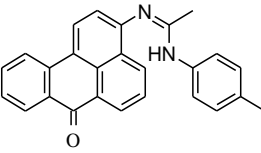
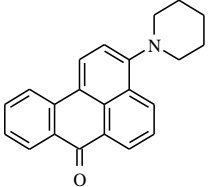
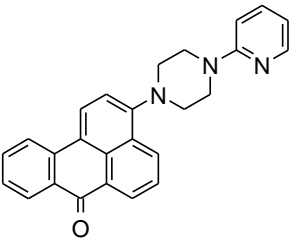
krāsošanas protokolu izstrādē. Sintezēto luminoforu apraksts ir apkopots 4. tabulā. Benzantronu luminoforu šķīdināšanai tika izmantots etanols un visas krāsvielas tika pagatavotas ar molāro koncentrāciju $1 \cdot 10^{-5}$.

Visi analītiski tīrie reaģenti (Sigma-Aldrich, ASV) tika izmantoti tieši tādi kādi tie tika saņemti. Ķīmisko reakciju progress un produktu tīrība tika uzraudzīta ar plānslāņa hromatogrāfiju uz plāksnēm ar silikagelu, lietojot Merck Silica Gel F254 un izmantojot šķīdinātāju sistēmu benzols/acetoneitrils kā eluents. Kolonnu hromatogrāfija uz silikagela tika veikta, lietojot Merck plāksnītes Kieselgel (230-240 aci) ar benzolu kā eluentu. Kušanas temperatūra tika noteikta ar Kofler aparātu un tā netika mainīta. Tika izpētīts sintezēto luminoforu absorbcija un fluorescence dažādos organiskos šķīdinātājos (**I**, **II**, **III**, **IV**).

4. tabula

Sintezēto benzantronu luminoforu apraksts

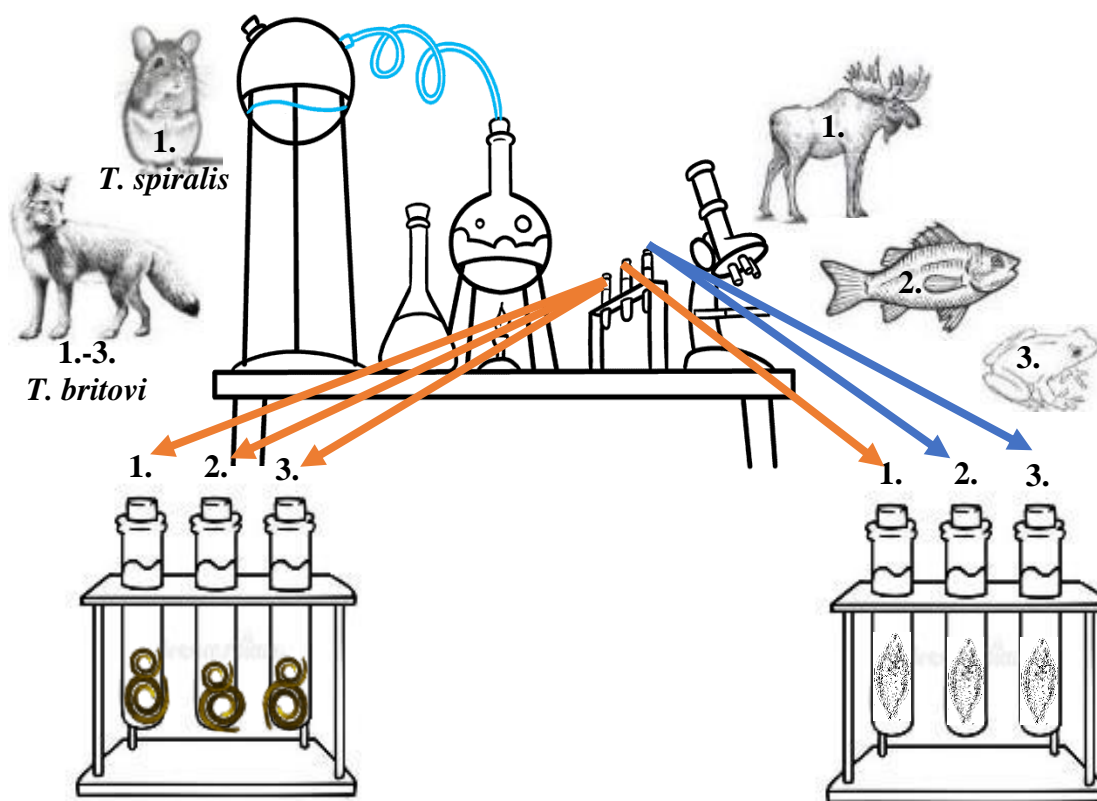
Bezantrona luminofora saīsinātais nosaukums	Bezantrona luminofora pilnais nosaukums	Molekulārā formula	Ķīmiskā struktūra	Funkcionālā grupa	Sintezēšanas procesa apraksts, atsaucē
AZPP (I)	3-N-(2-piperidinilacetamido)benzantrons	$C_{24}H_{22}N_2O_2$		amino un amido grupas	Kirilova et al., 2020
AM323 (I)	2-bromo-3-N-(N', N'-dimetilformamidino)benzantrons	$C_{20}H_{15}BrN_2O$		Broma atoms un amidino grupa	Kirilova et al., 2018
AZM (II)	3-N-[2-(4-morfolinil)acetamidino]benzantrons	$C_{23}H_{20}N_2O_3$		amino un amido grupas	Gavarane et al., 2019
AM1 (III)	3-N-(N', N'-dimetilbenzamidino)benzantrons	$C_{26}H_{20}N_2O$		amidino grupa	Kirilova et al., 2009

Bezantrona luminofora saīsinātais nosaukums	Bezantrona luminofora pilnais nosaukums	Molekulārā formula	Ķīmiskā struktūra	Funkcionālā grupa	Sintezēšana s procesa apraksts, atsauce
AM2 (III)	3-N-(N', N'- dimetilacetami dino)benzantrons	$C_{21}H_{18}N_2O$		amidino grupa	Kirilova et al., 2009
AM4 (III)	3-N-(N', N'- dietilacetamidi no)benzantron s	$C_{23}H_{22}N_2O$		amidino grupa	Kirilova et al., 2009
AM16 (III)	3-N-[N'-(4- metilfenil)acet amidino]benza ntrons	$C_{26}H_{20}N_2O$		amidino grupa	Gonta et al., 2013
P8 (III)	3-N- piperidinilbenz antrons	$C_{22}H_{19}NO$		amino grupa	Kirilova et al., 2008
P 13 (IV)	3-N-[4-(2- piridil)piperazi n-1- il]benzantrons	$C_{26}H_{21}N_3O$		amino grupa	Gavarane et al., 2018

2.2. Pētāmais materiāls

Pētījuma gaitā tika izmantoti helmintu paraugi no DU DZTI Ekoloģijas departamenta Parazitoloģijas un Histoloģijas laboratorijas. Izmantoto materiālu raksturojums atspoguļots 10. attēlā.

**DU DZTI Ekoloģijas departamenta Parazitoloģijas un
Histoloģijas laboratorija**



1. *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuri (izolēti no dzīvnieku muskulatūras un fiksēti) (II)
2. *T. britovi* kāpuri (uzglabāti 96,6% etanolā) (IV)
3. *T. britovi* kāpuri sasaldētā (-20°C temperatūrā) dzīvnieku muskulatūrā (IV)

—→ Poikiloterms saimnieks
—→ Homoterms saimnieks

1. *P. fasciolaemorpha* (ad.) (I) fiksēts 70% un 96% etanolā; AFA, Karnoja un Bouina šķīdumā, 10% neitrāli buferētā formalīnā
2. *D. spathaceum* (mtc.) (III) fiksēts 96% etanolā
3. *D. subclavatus* (ad.) fiksēts Karnoja šķīdumā, *P. confusus* (ad.) (III) fiksēts 96% etanolā un AFA šķīdumā

10. attēls. Pētījumā izmantotais materiāls (Rubeniņa, 2022)

2.3. Pētāmā materiāla ķīmiskā fiksēšana

Turpmākai paraugu izpētei ir svarīgi apbērt un noteikt ķīmisko fiksatoru paraugu neilgai/ilgstošai uzglabāšanai. Parazīts var tikt uzglabāts pat gadiem ilgi, ja ir bijis pareizi izvēlēts un pagatavots ķīmiskais fiksators. Kopumā tika izmantoti septiņi ķīmiskie fiksatori, no kuriem trīs bija gatavi lietošanai uzreiz (etanolī), bet četri fiksatori bija jāgatavo pirms paraugu fiksēšanas. Informācija par pielietoto fiksatoru nosaukumiem un to ķīmiskajiem sastāviem ir apkopota 5. tabulā.







Pētījumā izmantotie ķīmiskie fiksatori

Ķīmiskā fiksatora nosaukums	Attiecība	Ķīmiskais sastāvs	Daudzums, ml vai g
70% etanols	NP	70% etanols	NP
96 % etanols	NP	96 % etanols	NP
96,6 % etanols	NP	96,6 % etanols	NP
AFA šķīdums	17:2:1	<ul style="list-style-type: none"> • 85% etanols • 40% formalīns • ledus etiķskābe 	85 ml 10 ml 5 ml
Karnoja šķīdums	6:3:1	<ul style="list-style-type: none"> • 100% absolūtais etanols • hloroforms • ledus etiķskābe 	60 ml 30 ml 10 ml
Bouina šķīdums	15:4:1	<ul style="list-style-type: none"> • pikrīnskābes ūdens šķīdums • 40% formalīns • ledus etiķskābe 	75 ml 20 ml 5 ml
10% neitrāli buferēts formalīns	NP	<ul style="list-style-type: none"> • destilēts ūdens • 40% formalīns • nātrija dihidrogēnfosfāts • nātrija hidrogēnfosfāts (bezūdens) 	900 ml 100 ml 4.0 g 6.5 g

NP – nav piemērojams

Izolētie Trematoda parazīti un to olas uzreiz tika fiksēti dažādos ķīmiskos fiksatoros (**I**, **III**). Informācija par trematodes paraugu fiksēšanu un uzglabāšanas apstākļiem ir apkopota 6. tabulā.

Trematoda parazītu sugu paraugu ķīmiskā fiksēšana un uzglabāšana

Ķīmiskais fiksators	70% etanols (I)	96 % etanols (I, III)	AFA šķīdums (I, III)	Karnoja šķīdums (I)	Bouina šķīdums (I)	10% neitrāli buferēts formalīns (I)
Fiksēšanas ilgums <i>P. fasciolaemorpha</i>	Līdz izmeklēšanai	Līdz izmeklēšanai	2 h	2 h	2 h	Līdz izmeklēšanai
						

Ķīmiskais fiksators	70% etanols (I)	96 % etanols (I, III)	AFA šķīdums (I, III)	Karnoja šķīdums (I)	Bouina šķīdums (I)	10% neitrāli buferēts formalīns (I)
Fiksēšanas ilgums saldūdens trematodēm	-	Līdz izmeklēšanai	1 h	1 h	-	-
Skalošana <i>P. fasciolaemorpha</i>	Nav piemērojama	Nav piemērojama	70% etanols	70% etanols	70% etanols	Nav piemērojama
Skalošana saldūdens trematodēm	-	Nav piemērojama	96 % etanols	96 % etanols	-	-
Ķīmiskais fiksators, kurā tiek uzglabāti <i>P. fasciolaemorpha</i>	70% etanols	96 % etanols	70% etanols	70% etanols	70% etanols	10% neitrāli buferēts formalīns
Ķīmiskais fiksators, kurā tiek uzglabātas saldūdens trematodes	-	96 % etanols	96 % etanols	96 % etanols	-	-
Uzglabāšana	ledusskapī +4°C temperatūrā līdz nākamai izmeklēšanai					

- ķīmiskais fiksators netika izmantots materiāla fiksēšanai

Izolētie *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru paraugi uzreiz pēc izdalīšanas no dzīvnieku muskulatūras 1 stundu tika fiksēti četros dažādos ķīmiskos fiksatoros. Pēc tam paraugi tika skaloti un uzglabāti 70 % etanolā (II) vai uzglabāti 96,6 % etanolā no 1 - 5 gadiem, vai arī kāpuri netika izolēti, bet tika sasaldēti (-20°C) dzīvnieka muskulatūrā no 1 – 5 gadiem (IV) atbilstoši 2015/1375 regulas prasībām. Informācija par trihinellas paraugu fiksēšanu un uzglabāšanas apstākļiem ir apkopota 7. tabulā.

7. tabula

<i>T. spiralis</i> un <i>T. britovi</i> parazītu sugu paraugu ķīmiskā fiksēšana un uzglabāšana					
Ķīmiskais fiksators	70% etanols (II)	96,6% etanols (IV)	AFA šķīdums (II)	Bouina šķīdums (II)	Karnoja šķīdums (II)
Fiksēšanas ilgums	Līdz izmeklēšanai	Līdz izmeklēšanai	1 h	1 h	1 h
Skalošana	Nav piemērojama	Nav piemērojama	70% etanols	70% etanols	70% etanols
Ķīmiskais fiksators, kurā tika uzglabāti kāpuri	70% etanols	96,6% etanols	70% etanols	70% etanols	70% etanols
Uzglabāšanas temperatūra	ledusskapī +4°C līdz nākamai izmeklēšanai	ledusskapī +4°C līdz nākamai izmeklēšanai	ledusskapī +4°C līdz nākamai izmeklēšanai	ledusskapī +4°C līdz nākamai izmeklēšanai	ledusskapī +4°C līdz nākamai izmeklēšanai
Uzglabāšanas ilgums	Diena līdz 1 gadam	1 – 5 gadi	Diena līdz 1 gadam	Diena līdz 1 gadam	Diena līdz 1 gadam

2.4. Krāsošanas protokoli ar specifisku benzantrona luminoforu

Kopumā tika sintezēti deviņi benzantrona luminofori ar trīs dažādām funkcionālām grupām. Pētījuma laikā Trematoda un Nematoda paraugi tika krāsoti ar visiem trim funkcionālo grupu luminoforiem. Tomēr, Nematoda paraugi netika krāsoti ar bromu atomu saturošo luminoforu. Benzantrona luminoforu funkcionālās grupas un krāsoto paraugu raksturojums ir apkopots 8. tabulā.

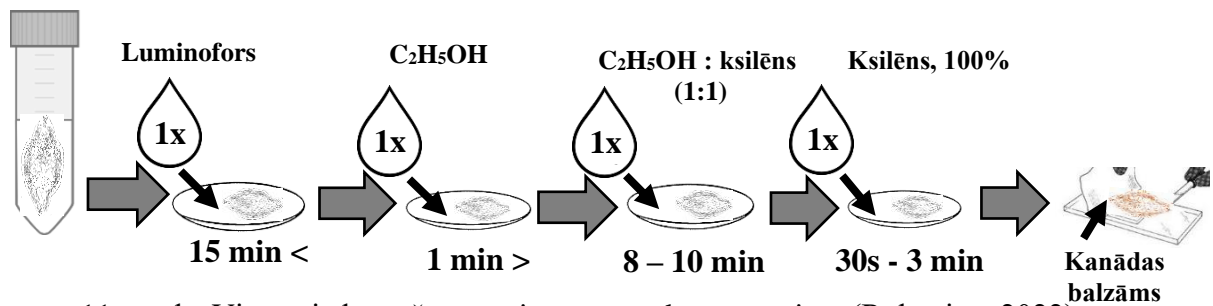
Benzantronu luminoforu funkcionālās grupas un krāsoto paraugu raksturojums				
Benzantronu luminofori				
Funkcionālā grupa	amino un amido grupa	amino grupa	amidino grupa	Broma atoms
Luminofora saīsinātais nosaukums	AZM (II)	P8 (III)	AM1, AM2, AM4, AM16 (III)	AM323 (I)
	*Nematode: <i>T. britovi</i> (kāpurs) (70% etanols, Bouina šķīdums, Karnoja šķīdums, AFA)	#Trematode: <i>P. confusus</i> (ad.) (96% etanols, AFA)	#Trematode: <i>P. confusus</i> (ad.) (96% etanols, AFA)	
	*Nematode: <i>T. spiralis</i> (kāpurs) (70% etanols, Bouina šķīdums, Karnoja šķīdums, AFA)	#Trematode: <i>D. spathaceum</i> (mtc.) (96% etanols)	#Trematode: <i>D. spathaceum</i> (mtc.) (96% etanols)	*Trematode: <i>P. fasciolaemorpha</i> (ad.) (70% etanols, 96% etanols, AFA, Karnoja šķīdums, Bouina šķīdums, 10% neitrāls formalīna buferšķīdums)
	AZPP (I)	P13 (IV)	#Trematode: <i>D. subclaviatus</i> (ad.) (Karnoja šķīdums)	
	*Trematode: <i>P. fasciolaemorpha</i> (ad.) (70% etanols, 96% etanols, AFA, Karnoja šķīdums, Bouina šķīdums, 10% neitrāls formalīna buferšķīdums)	*Nematode: <i>T. britovi</i> (kāpurs) (70% etanols, 96,6% etanols 1-5 gadi, sasaldētā dzīvnieka muskulatūrā)		

Homotermie saimnieki

* Poikilotermie saimnieki

2.4.1. Trematoda paraugi (I, III)

Luminofori AZPP un AM323 tika sintezēti *P. fasciolaemorpha* fiksētiem 70% un 96% etanolā, AFA, Karnoja un Bouina šķīdumā vai 10% neitrālā formalīna buferšķīdumā efektīvai un ātrai izpētei (I). Izstrādātais krāsošanas protokols tika pielietots paraugiem, kas iegūti no aļņa (*Alces alces*) (homoterma saimnieka). Trematoda paraugu vispārēja krāsošanas gaita ir atspoguļota 11. attēlā.



11. attēls. Vispārēja krāsošanas gaita trematodes paraugiem (Rubeniņa, 2022)

Izstrādātais krāsošanas protokols *P. fasciolaemorpha* paraugiem sākas ar to, ka no stobriņa ar stikla pipeti tika izņemts trematodes paraugs, pēc tam paraugs tika novietots pulksteņstikliņā. Pulksteņstiklā tika pievienots luminofors, tikai tik daudz, lai tas pārklātu paraugu pilnībā. Pēc luminofora pievienošanas virsū pulksteņstiklam tika uzlikts Petri trauks, lai izvairītos no luminofora izgarošanas. Paraugs tika turēts luminoforā 15 minūtes, pēc tam Petri trauks tika noņemts. Ar stikla pipeti tika noņemts liekais šķidrums un ar citu stikla pipeti tika pievienots 96% etanols, pārklājot iekrāsoto paraugu pilnībā. Paraugs tiks turēts etanolā maksimums 1 minūti. Ar stikla pipeti tika noņemts liekais šķidrums un ar citu stikla pipeti tika pievienots etanola:ksilēna (1:1) šķīdums, pārklājot visu paraugu. Paraugs tika turēts šķīdumā 8-10 minūtes, laiks bija atkarīgs no parauga biezuma. Atkal ar stikla pipeti tika noņemts liekais šķidrums un ar citu stikla pipeti tika pievienots 100% ksilēns, pārklājot visu paraugu. Atkarībā no parauga biezuma, iekrāsotā trematode tika turēta ksilēnā no 30 sekundēm – 3 minūtēm, līdz trematode kļuva pilnībā caurspīdīga. Ar stikla pipeti tika noņemts liekais šķidrums un trematode tika pārceļta no pulksteņstikla uz priekšmetstiklu. Viss krāsošanas process tika veikts, skatoties caur stereomikroskopu SMZ800 (Nikon, Japāna). Tīkmēr tika iedegta spirta lampiņa. Ar pašu skalpeļa galu tika paņemts neliels daudzums Kanādas balzāma (Sigma-Aldrich, Vācija). Uz skalpeļa esošais balzāms tika uzsildīts un tad pārliets uz priekšmetstikla netālu no parauga. Pēc tam, sekojot līdz tam, lai trematode pilnībā tiktu iecementēta balzāmā, tika uzlikts segstikliņš (24x24mm). Segstikliņa malas tika pārklātas ar adhēzīvu līmi (Marabu Fixogum, Vācija). Visi paraugi tika parakstīti, norādot parauga numuru, ķīmisko fiksatoru, luminofora nosaukumu, datumu, kad izveidots patstāvīgais paraugs.

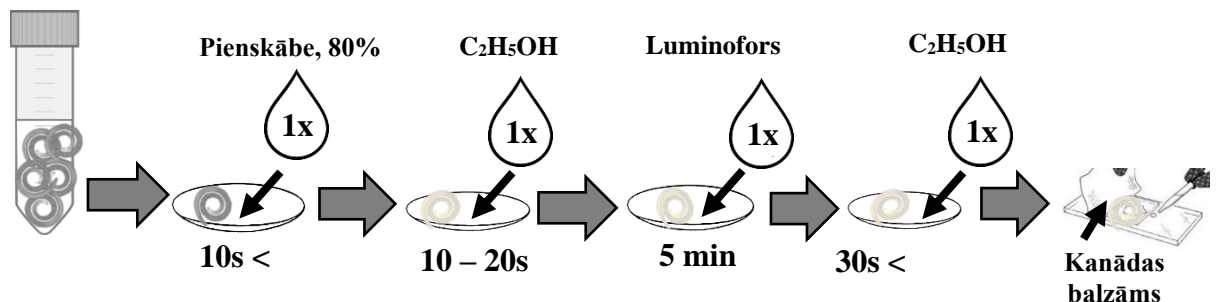
Luminofori AM1, AM2, AM4, AM16 un P8 tika sintezēti saldūdens trematodes *D. spathaceum* (mtc.) fiksētai 96% etanolā, *D. subclaviatus* (ad.) fiksētai Karnoja šķīdumā un *P. confusus* (ad.) fiksētai AFA šķīdumā efektīvai un ātrai izpētei (III). Izstrādātais krāsošanas protokols tika pielietos paraugiem, kas iegūti no bezastainiem abiniekiem (*D. subclaviatus*, *P. confusus*) un saldūdens zivīm (*D. spathaceum*)

(poikilothermie saimnieki). Vispārējā krāsošanas gaita tika saglabāta tāda pati kā homotermo saimnieku parazītiem, tomēr poikilotermo saimnieku parazītu krāsošanas protokolā bija atšķirīgs paraugu krāsošanas laiks, krāsu skalošanas un dehidratācijas solis:

- Paraugs tika krāsots ar vienu no sintezētajiem benzantronu luminoforiem 10 minūtes.
- Pēc tam krāsotā trematode tika trīs reizes skalota ar 70% etanolu.
- Tad tika veikts dehidratācijas solis, paraugs tika turēts 96% etanolā, pēc tam 80% etanolā un tad 70% etanolā. Katrs solis ilga 5-10 minūtes.
- Sagatavotais paraugs konfokālai lāzerskenējošai mikroskopijai tika turēts tumsā līdz izpētei.

2.4.2. Nematoda paraugi (II, IV)

Parazītiskās nematodes trihinella struktūras izpētei tika sintezēti divi benzantrona hidrofobie luminofori: AZM (II) un P13 (IV). Luminofors AZM tika izmantots kāpuriem, kuri izolēti no dzīvnieku muskulatūras un fiksēti 70% etanolā, Karnoja, Bouina vai AFA šķīdumā. Savukārt, luminofors P13 tika izmantots *T. britovi* kāpuriem, no kuriem daļa kāpuru bija fiksēta 96,6% etanolā no 1 līdz 5 gadiem un otra daļa kāpuru bija sasaldētā dzīvnieku muskulatūrā (-20°C temperatūrā, no 1 līdz 5 gadiem). Nematoda paraugu vispārējā krāsošanas gaita ir atspoguļota 12. attēlā.



12. attēls. Vispārējā krāsošanas gaita nematodes paraugiem (Rubeniņa, 2022)

Izstrādātais krāsošanas protokols *T. spiralis* un *T. britovi* paraugiem izolētiem no dzīvnieka muskulatūras un fiksētiem četros dažādos ķīmiskos fiksatoros (II) sākās ar to, ka pirms krāsošanas paraugi tika izņemti no ledusskapja un inkubēti istabas temperatūrā 15 min. No stobriņa tika paņemta *Trichinella* spp. un novietota pulksteņstiklā. Ar stikla pipeti pulksteņstiklā tika nedaudz pievienots 70% spirta, tādējādi izvairoties no trihinellas piekalšanas pie pulksteņstikla. Pēc tam turpat ar citu stikla pipeti tika pievienoti 80% pienskābes. Trihinellas kāpurs tika turēts pieskābē 10 sekundes. Ar stikla pipeti tika noņemts liekais šķidrums un ar citu stikla pipeti tika pievienots 70% etanols. Šis solis tika atkārtots trīs reizes, katrs pa 10-20 sekundēm. Ar stikla pipeti tika noņemts liekais šķidrums un ar citu stikla pipeti tika pievienots luminofors. Virsū pulksteņstiklam tika

likts stikla Petri trauks, pasargājot luminoforu no izgarošanas. Kāpurs luminoforā tika atstāts uz 5 minūtēm, pēc tam Petri trauks tika noņemts. Ar stikla pipeti tika noņemts liekais šķidrums un paraugs tika skalots ar 70% etanolu 30 sekundes. Ar stikla pipeti atkal tika noņemts liekais šķidrums un iekrāsotais kāpurs tika pārnesti uz priekšmetstiklu. Tikmēr tika iedegta spirta lampiņa. Ar skalpeļa galu tika paņemts neliels daudzums Kanādas balzāma (Sigma-Aldrich, Vācija) un balzāms tika uzsildīts. Uzsildītais balzāms tika uzlikts uz vienas no segstikla (24x24mm) malas. Segstikls tika uzlikts virsū krāsotajam paraugam, kas atradās uz priekšmetstikla. Segstikls uz priekšmetstikla tika likts, sākot no tās malas, kur tika uzlikts uzsildītais Kanādas balzāms. Pēc tam segstikla malas tika pārklātas ar adhezīvu līmi (Marabu Fixogum, Vācija). Sagatavotais paraugs tika parakstīts, norādot parauga numuru, sugas nosaukumu, fiksatorus, parauga sagatavošanas datumu. Jāmin, ka izstrādātais krāsošanas protokols tika izmēģināts ar komerciāli pieejamu benzantrona krāsvielu - 3-metoksibenzantroni. Vēl jo vairāk, izstrādātais trihinellu kāpuru krāsošanas protokols tika izmantots kāpura dzimuma noteikšanai. Balstoties uz gala zarnas garumu var noteikt vai kāpurs ir mātītei vai tēviņš, jo tēviņiem gala zarnas garums var sasniegt 63 μm, bet mātītēm tas vienmēr ir uz pusi mazāks – 30 μm (Kozek, 1975; Liu et al., 1991).

Luminofors P13 tika sintezēts *T. britovi* kāpuriem, kas uzglabājās sasaldētā dzīvnieku muskulatūrā līdz 5 gadiem vai 96,6% etanolā līdz 5 gadiem. Izstrādātais krāsošanas protokols tika pielietots *T. britovi* kāpuriem, kas izdalīti no rudās lapsas (*Vulpes vulpes*) kājas muskulatūras un *T. spiralis* paraugiem, kas izdalīti no peles.

2.5. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopijas metode (I, II, III, IV)

Visi krāsotie paraugi tika pētīti, izmantojot *Nikon Eclipse Ti-E* konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu (Nikon, Japāna), kas ir konfigurēts ar ātrgaitas multifotonu *AIR MP* konfokālo sistēmu un aprīkots ar digitālo DS-U3 kameru (Nikon, Japāna). Uzsākot darbu pie konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa, vispirms tika ieslēgts dators, tad fluorescences gaismas avots, kamera, mikroskops, skenēšanas ierīce, 4 moduļu fotodetektora ierīce un kā pēdējais lāzeru barošanas bloks. Savukārt, beidzot darbu vispirms tika izslēgts lāzeru barošanas bloks un kā pēdējais tika izslēgts dators. Datoram ieslēdzoties, tika atvērta *NIS – elements Advanced Research 3.2. 64 – bit* programmatūra. Pēc tam tika paņemts sagatavotais helminta paraugs, kurš otrādi (ar segstikliņu uz leju) tika uzlikts uz priekšmetgaldiņa. Pirms skatīšanās mikroskopa okulāros, tika pārbaudīts

vai lāzeri ir izslēgti, tas nozīmē, vai uz *Ti – Pad* dega ieslēgta E100 funkcija, kas bloķē lāzerus. Tikmēr mikroskopā tika meklēts paraugs un noregulēts asums, pamazām pārslēdzoties uz ar vien lielāku palielinājumu. Tajā brīdī, kad mikroskopā redzamo attēlu vajadzēja pārslēgt uz monitoru, tika izmantota L100 funkcija, kas arī atrodama uz *Ti – Pad*. Kvalitatīvu datu ieguvei un to savstarpējai salīdzināšanai katram pētāmajam paraugam tika mainīti skenēšanas iestatījumi, piemēram, “*HV*” - nosaka fluorescējoša objekta spilgtumu; “*Offset*” – nosaka fona trokšņus; “*Pinhole*” – nosaka parauga izšķirtspēju, “*Laser*”, skenēšanas ātrums un virziens, iegūstot optimālāko rezultātu. Pētījuma paraugi tika aprakstīti, izmantojot CFI (10x/22) okulārus un šādus objektīvus:

- Plan Apo 4x/0,2 OFN25 WD 2,0;
- Plan Apo 10x/0,45 DIC N1 OFN25 WD 4,0;
- Plan Apo 20x/0,75 DIC N2 ∞/0,17 WD 1,0;
- Plan Apo 40x/0,95 DIC MN2 OFN25 WD 0,14;
- Plan Apo VC 60xA/1,20 WI ∞/0,15-0.18 WD 0,31-0,28.

Fluorescences ierosināšanai tika izmantoti šādi lāzeri kopā ar DU4 detektoru:

- *Ch2* zaļais lāzeris $\lambda = 488$ nm ar FITC filtru (500–550 nm) (**I, II, III, IV**);
- *Ch3* oranžais lāzeris $\lambda = 561$ nm ar TRICT filtru (570-620 nm) (**III, IV**);
- *Ch4* sarkanais lāzeris $\lambda = 638$ nm ar Cy5 filtru (662-737 nm) (**I**).

Turpmākai datu apstrādei, iegūtie dati tika saglabāti .jpg un *ND2 Image File* formātā. Attēlu apstrādei tika izmantota *NIS Elements Advanced Research 3.2 64-bit* programmatūra (Nikon, Japāna). Programmatūras ietvaros tika veikti momentuzņēmumi (no angļu val. “*Capture*”) dažādos pētāmā parauga optiskā griezuma slāņos (viens griezuma slānis bija 0,9 μm biezs), veikta uzņēmumu apstrāde un modifikācija, ar “*Polyline*” funkciju no funkciju kopas “*Annotations and Measurements*” tika veikti parazītu mērījumi (**I, II, III, IV**). Attēli tika apstrādāti ar *Corel Photo-Paint x6* (Corel Corporation, Kanāda) (**III, IV**).

Paraugu autofluorescence tika mērīta pie 405 nm viļņu garuma ar filtru pie 425-580 nm un 488 nm ar filtru pie 500 – 655 nm viļņu garumiem, autofluorescences ierosināšanai tika izmantotas vienādas intensitātes. Iekšējais spektrālais detektors veica fluorescences signāla reģistrāciju. Fluorescences signāla reģistrācijas sākuma viļņa garums tika izvēlēts par 20 nm augstāks nekā ierosmes viļņa garums līdz sarkanā redzamā spektra robežai (**I, II**).

3. REZULTĀTI

Pētījuma laikā tika izpētīti un aprakstīti trematodes parazitāri un trihinellas kāpuri, kas tika glabāti DU DZTI Ekoloģijas departamenta Parazitoloģijas un Histoloģijas laboratorijā. Paraugi laboratorijā glabājās no vienas dienas līdz pat 5 gadiem, glabāšanas temperatūras amplitūda bija no +4°C (ledusskapī) līdz -20°C temperatūrai (saldētavā). Pētījuma gaitā tika izstrādāti krāsošanas protokoli gan Trematoda, gan Nematoda parazitūtu sugu paraugiem. Krāsošanas protokoli ir paredzēti paraugu efektīvai un ātrai izpētei ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju. Šajā nodaļā tiek aprakstīti pētījumā iegūtie rezultāti.

3.1. Trematoda paraugu fiksēšana un uzglabāšana

Šajā sadaļā ir aprakstīti kādi ķīmiskie fiksatori tika izmantoti katrai trematodes parazitūtu sugai, aprakstīts vai ķīmiskais fiksators radījis fiziskus bojājumus paraugā, kā arī aprakstīts kādi bijuši paraugu uzglabāšanas apstākļi. Sadaļā aprakstīts kurš no ķīmiskajiem fiksatoriem ir piemērotākais trematodes parazitūtu paraugu fiksēšanai.

3.1.1. *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (I)

Pētījuma laikā katrai ķīmiskā fiksatora (kopumā 6 fiksatori) un luminofora (kopumā divi benzantrona luminofori) kombinācijai tika izmantotas 30 trematodes, veicot trīs krāsošanas atkārtojumus. Kopumā, visa eksperimenta gaitā tika nokrāsotas 1080 trematodes.

Ķīmiskās fiksācijas laikā paraugos netika novērotas būtiskas morfoloģiskās izmaiņas. Tomēr, Karnoja šķīdumā fiksētās trematodes bija nedaudz palielinājušās izmēros. Pēc fiksācijas bija novērojams, ka etanolā esošie paraugi bija kļuvuši nedaudz tumšāki. Savukārt, Bouina šķīdums visus paraugus nokrāsoja dzeltenā krāsā un pēc tam fiksatoru nebija iespējams izskalot. Tas skaidrojams ar to, ka Bouina šķīdums satur pirīnskābi, kas ir dzeltenā krāsā, attiecīgi arī pats šķīdums kļuva dzeltens pēc skābes pievienošanas. Ķīmisko fiksatoru iedarbība uz paraugiem tika novērota divas reizes: laikā, kad paraugs tika sagatavots uzglabāšanai, novērojot vai paraugos rodas kādas morfoloģiskas izmaiņas un KLSM laikā, izvērtējot kura no fiksatora un benzantrona luminofora savienības ir bijusi vispiemērotākā konfokālai lāzerskenējošai mikroskopijai. Ķīmisko fiksatoru radīto fizisko bojājumu salīdzinājums ir apkopts 9. tabulā.

Ķīmisko fiksatoru *P. fasciolaemorpha* paraugos radīto fizisko izmaiņu salīdzinājums

Ķīmiskais fiksators	Fiziskas izmaiņas paraugā	Komentāri
70% etanols	–	Optimāla etanola koncentrācija trematodes paraugu fiksācijai, nekādi paraugu bojājumi, paraugs pēc fiksācijas kļuva nedaudz tumšāks
96% etanols	+	Paraugšs pēc fiksācijas kļuva cietāks, paraugu bija grūtāk saspiest starp segstikliņu un priekšmetsikliņu, pēc fiksācijas paraugs kļuva nedaudz tumšāks
AFA šķīdums	–	Paraugā netika novērotas fiziskas izmaiņas
Karnoja šķīdums	+	Paraugšs piesūcinājās ar fiksatoru, kā rezultātā paraugs kļuva lielāks izmēros (dati nav parādīti)
Bouina šķīdums	+	Fiksatoru nevarēja izskalot, paraugs kļuva dzeltens
10% neitrāli buferēts formalīns	–	Paraugā netika novēroti bojājumi

- paraugā netika novērotas fiziskas izmaiņas

+ paraugā tika novērotas fiziskas izmaiņas

P. fasciolaemorpha ir relatīvi biezākas, salīdzinot to ar citām trematodes sugām, piemēram, ar *P. confusus*. Tas nozīmē, ka fiksācijas procesā *P. fasciolaemorpha* uzsūca lielāku daudzumu ķīmiskā fiksatora nekā saldūdens trematodes parazītu sugas. Pēc fiksācijas Bouina šķīdumā tika novērots, ka fiksatoru nevar pilnībā izskalot, kā rezultātā fiksators ietekmēja paraugu izpēti KLSM laikā un iegūto datu kvalitāti.

3.1.2. Saldūdens trematodes (III)

Visas saldūdens trematodes tika uzglabātas 96% etanolā, ledusskapī +4°C temperatūrā līdz nākamai izmeklēšanai. Nedēļu glabātos *D. spathaceum* (mtc.) un *D. subclaviatus* (ad.) nebija novērojamas fiziskas izmaiņas un paraugus varēja izmantot turpmākai izmeklēšanai, tomēr *P. confusus* paraugi bija bojāti. Krāsošanas laikā *P. confusus* paraugs sadalījās, tas bija kļuvis pārāk trausls vai arī KLSM laikā paraugos tika novēroti melni plankumi, kas liecināja par fiziskiem pārrāvumiem ķermenī.

3.2. *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru fiksēšana un uzglabāšana (II, IV)

Pētījuma laikā tika izmantoti no dzīvnieku muskulatūras izolētie trihinella kāpuri (II), kāpuri, kas tikuši glabāti 96,6% etanolā vai kāpuri, kas tika iegūti no –20°C

temperatūrā sasaldētas muskulatūras (IV). Tūlīt pēc izolēšanas kāpuri tika fiksēti dažādos ķīmiskos fiksatoros. Paraugu fiksēšanas brīdī un turpmākā uzglabāšanas periodā tika novērots vai kāds no ķīmiskiem fiksatoriem rada paraugos fiziskas izmaiņas. Ķīmisko fiksatoru radīto fizisko bojājumu salīdzinājums ir apkopts 10. tabulā.

10. tabula

Ķīmisko fiksatoru trihinella paraugos radīto fizisko izmaiņu salīdzinājums

Ķīmiskais fiksators	Fiziskas izmaiņas paraugā	Glabāšanas ilgums	Komentāri
AFA šķīdums	-	Diena līdz 1 gadam	
Bouina šķīdums	-	Diena līdz 1 gadam	Ar gaismas mikroskopiju netika novēroti fiziski bojājumi paraugā
Karnoja šķīdums	-	Diena līdz 1 gadam	
70% etanols	-	1 – 5 gadi	
96,6 % etanols	-	1 – 5 gadi	

- paraugā nebija novērojamas fiziskas izmaiņas

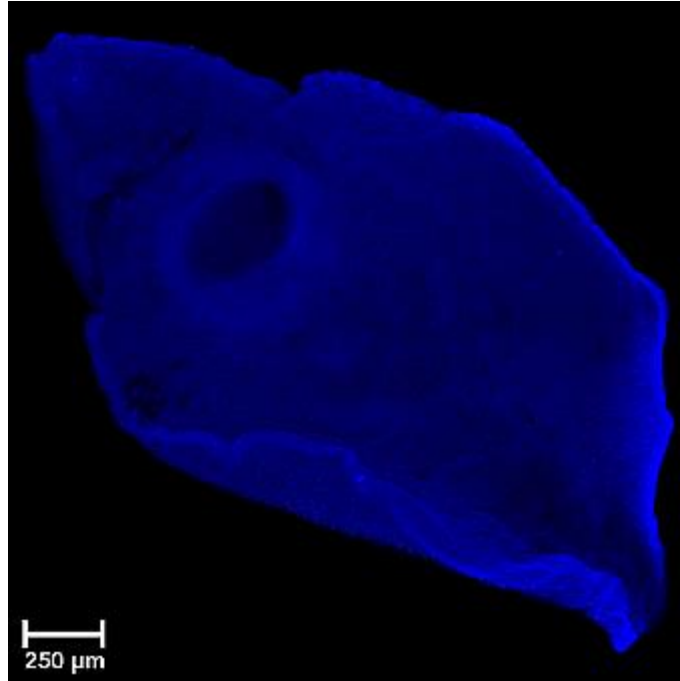
+ paraugā bija novērojamas fiziskas izmaiņas

3.3. Trematoda paraugu efektīva un ātra izpēte

Šajā sadaļā ir aprakstīti ar konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju iegūtie rezultāti, izmantojot noteiktus krāsošanas protokolus un specifiskus benzantrona luminoforus homotermo un poikilotermo saimnieku trematodes efektīvai un ātrai izpētei. Kā arī aprakstīti autofluorescences un fluorescences novērojumi.

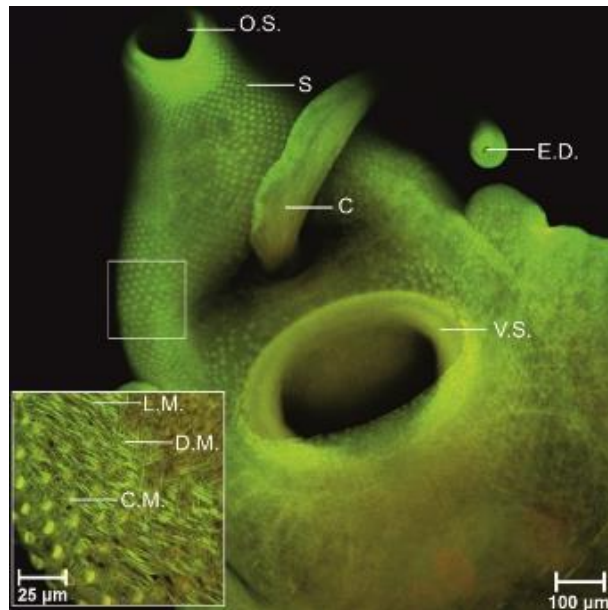
3.3.1. *P. fasciolaemorpha* (I)

Pirms paraugu fiksēšanas un krāsošanas procedūrām, tika veikta kontroles parauga izpēte. Trematode, kas vēl nebija ne fiksēta, ne krāsota ne ar vienu no benzantrona luminoforiem, tika pētīta ar KLSM metodi. Autofluorescences attēlos tika novērots, ka tiek izgaismota vispārējā ķermeņa forma, ir saskatāms, ka ķermeņa virsma nav gluda, ir atšķirams vēdera piesūcekņi un kopulācijas orgāns. Sīkākas struktūras vai orgānu sistēmas netika novērotas (skat. 13. attēlu).



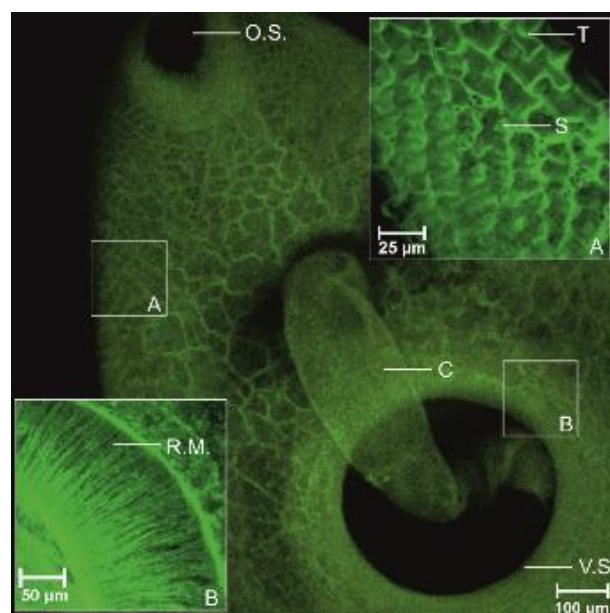
13. attēls. *Parafasciolopsis faciolaemorpha* (ad.) nekrāsots un ķīmiski nefiksēts paraugs, autofluorescence atbilstoši dažādiem ierosmes viļņiem (viens optiskais griezumš) (Rubeniņa, 2021)

Parazītu krāsošana tika veikta paralēli ar abām krāsām, iegūto rezultātu salīdzināšanai. Katra fiksētā trematode tika krāsota trīs reizes ar vienu un to pašu benzantrona luminoforu. Krāsošana ar AZPP luminoforu deva izcilus rezultātus visa trematodes ķermeņa izpētei jau zem x40 palielinājuma. Tika novērota ķermeņa virsmas struktūras, ieskaitot dzelkšņus, mutes un vēdera piesūcekņi bija viegli atšķirami no pārējā ķermeņa, tika vizualizēta ķermeņa telpiskā (dimensiju) struktūra (skat. 14. attēlu). Zem x100 palielinājuma vienlaicīgi tika novēroti trīs muskuļu slāņi: cirkulārais, diagonālais un gareniskais.



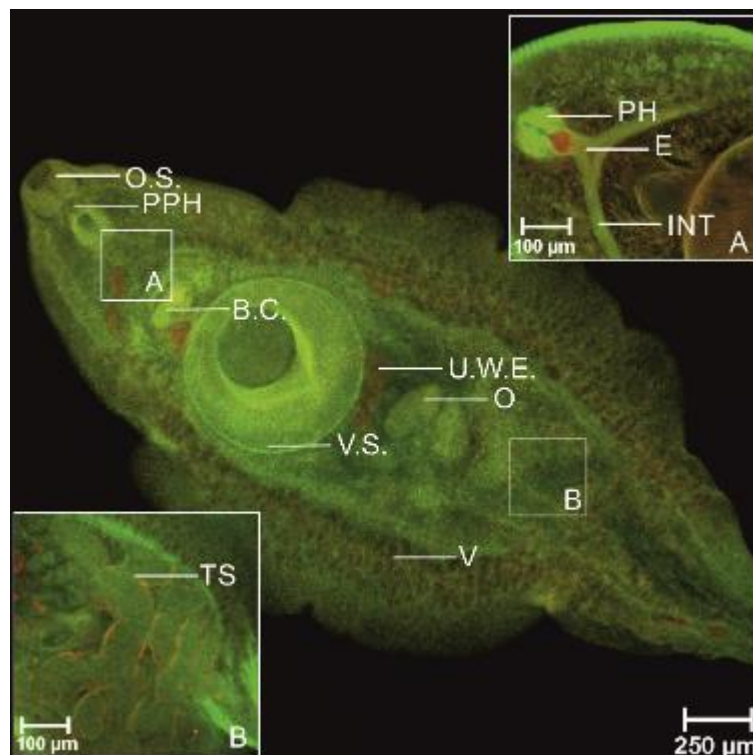
14. attēls. *Parafasciolopsis faciolaemorpha* (ad.) krāsota ar AZPP, fiksators 70% etanols (viens optiskais griezumš) (Rubeniņa, 2021). O.S. — mutes piesūcekšnis, V.S. — vēdera piesūcekšnis, S—dzelkšņi, C — kopulācijas orgāns, E.D. — ejakulācijas kanāls, L.M — gareniskās muskuļu šķiedras, D.M. — diagonālās muskuļu šķiedras, C.M. — cirkulārās muskuļu šķiedras

Mutes un vēdera piesūcekņos tika novērotas ne tikai cirkulārais un gareniskais muskuļu slānis, bet arī radiālais muskuļu slānis. Trematodes ķermeņa astes zonā tika skaidri novērotas parenhīmas šūnas. Tika novērots regulārs tīkls, kas apņēma visu trematodes ķermeni – teguments (skat. 15. attēlu).



15. attēls. *Parafasciolopsis faciolaemorpha* (ad.) krāsota ar AZPP, fiksators 70% etanols (viens optiskais griezumš) (Rubeniņa, 2021). O.S. — mutes piesūcekšnis, V.S. — vēdera piesūcekšnis, C — kopulācijas orgāns, T — teguments, S — dzelkšņi, R.M. — radiālās muskuļu šķiedras

Trematodes ķermeni klāj dzelkšņi. Ar benzantrona krāsvielu un KLSM palīdzību tika izpētīta vieta, kur dzelkšņi ir savienoti ar tegumentu. Mutes piesūcekņis turpinājās īsā pre-rīklē un tad rīklē. Barības vads sadalījās divos zaros, pa vienam katrā ķermeņa pusē. Netika novērotas divertikulas, zarnas bija gludas un skaidri iezīmējās ekskrecijas dziedzeris. Reproductīvā sistēma tika novērota līdz sīkākajām detaļām, ieskaitot kopulācijas orgāna radiālos muskuļus un dzelkšņus uz tā. Ne visos krāsotajos paraugos bija novērojamas olnīcas. Dzemdes izpēte bija iespējama, izmantojot AZPP kopā ar 70% etanolu, ar citiem luminofora un ķīmiskā fiksatora sastāviem tā netika novērota. Tā kā paraugs tika saspīests starp segstiklu un priekšmetstiklu, parazīta olas izskatījās iegarena ovāla formā un tās vienmēr tika novērotas dzemdē vai vēdera piesūcekņa tuvumā. Dzeltenuma dziedzera veidotās folikulas tika novērotas abās ķermeņa pusēs, dorsāli pret zarnām (skat. 16. attēlu). Folikuli tika novēroti sākot ar barības vadu līdz ķermeņa astes galam. Tā kā *P. fasciolaemorpha* ir hermafrodīts, tika novēroti divi neregulāri sēklinieki, kas atradās zem vēdera piesūcekņa.



16. attēls. *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (ad.) krāsota ar AZPP, fiksators AFA (viens optiskais griezum) (Rubeniņa, 2021). O.S.— mutes piesūcekņis, PPH — pre-rīkle, PH — rīkle, E — barības vads, C — kopulācijas orgāns, V — dzeltenuma dziedzeris, TS — sēklinieki, O — olnīcas, INT — zarnas, V.S. — mutes piesūcekņi, U.W.E. — dzemde pildīta ar olām

Salīdzinot rezultātus starp AZPP un AM323 luminoforiem, ar AM323 iegūtie izpētes rezultāti bija mazāk detalizēti, attēli bija neskaidrāki. Iegūtie dati ir apkopoti 11. tabulā.

11. tabula

Ķīmisko fiksatoru un benzantrona luminofora rezultātu salīdzinājums, izmantojot
KLSM

Pazīme	Benzantro na luminofors	Konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas rezultāts Tika novērots (+)/Netika novērots (-)					
		70% etanols	96% etanols	AFA šķīdums	Karnoja šķīdums	Bouina šķīdums	10% neitrāli buferēts formalīns
Visa ķermeņa kontūra ir detalizēti iezīmēta	AZPP	+	-	+	-	+	+
	AM323	+	-	+	+	-	-
Dzelkšņi un to izkārtojums uz virsmas ir detalizēti iezīmēti	AZPP	+	+	+	+	+	-
	AM323	-	-	+	+	-	-
Dzelkšņu telpiskā struktūra	AZPP	+	-	+	-	-	-
	AM323	-	-	-	-	-	-
Teguments	AZPP	+	-	-	-	-	+
	AM323	-	-	-	-	-	-
	AZPP	+	-	+	+	-	-
Vienā palielinājumā var novērot ķermeņa muskuļu slāņus (cirkulāros, diagonālos, gareniskos)	AM323	-	-	+	+	-	-
Mutes piesūcekņa muskuļu šķiedras, radiālā simetrija	AZPP	+	-	-	-	-	-
	AM323	-	-	-	-	-	-
Vēdera piesūcekņa muskuļu šķiedras, radiālā simetrija	AZPP	+	-	-	-	-	-
	AM323	-	-	-	-	-	-
Rīkle, muskuļu šķiedras ir detalizēti atšķiramas savā starpā	AZPP	+	+	+	-	-	-
	AM323	-	-	+	-	-	-
Barības vadu var detalizēti atšķirt no pārējās gremošanas sistēmas	AZPP	+	-	+	-	-	-
	AM323	+	-	-	-	-	-
Zarnas var detalizēti atšķirt no pārējās gremošanas sistēmas	AZPP	+	-	+	-	-	-
	AM323	-	-	+	-	-	-
	AZPP	-	-	-	+	-	-

Pazīme	Konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas rezultāts						
	Tika novērots (+)/Netika novērots (-)						
	Benzantrona luminofors	Ķīmiskais fiksators					10% neitrāli buferēts formalīns
	70% etanols	96% etanols	AFA šķīdums	Karnoja šķīdums	Bouina šķīdums		
Parenhīmas šūnas ir detalizēti iezīmētas	AM323	-	-	+	+	-	-
Kopulācijas orgāns ir detalizēti iezīmēts	AZPP	+	-	-	-	-	-
Olnīcas ir detalizēti iezīmētas	AM323	-	-	+	-	-	-
	AZPP	+	-	-	-	-	-
	AM323	-	-	-	-	-	-
	AZPP	+	-	-	-	-	-
Dzemde pildīta ar olām	AM323	-	-	-	-	-	-
Dzeltenuma dziedzeri ir detalizēti iezīmēti	AZPP	-	-	-	-	-	+
	AM323	-	-	-	-	+	-
Sēklinieki ir detalizēti atšķirami no pārējās reproduktīvās sistēmas	AZPP	-	-	+	-	-	-
	AM323	-	-	+	-	-	-
Kopā +/- (16)	AZPP	13/3	2/14	8/8	2/14	2/14	3/13
Kopā +/- (16)	AM323	2/14	0/16	7/9	4/12	1/15	0/16

- pazīme netika novērota

+ pazīme tika novērota

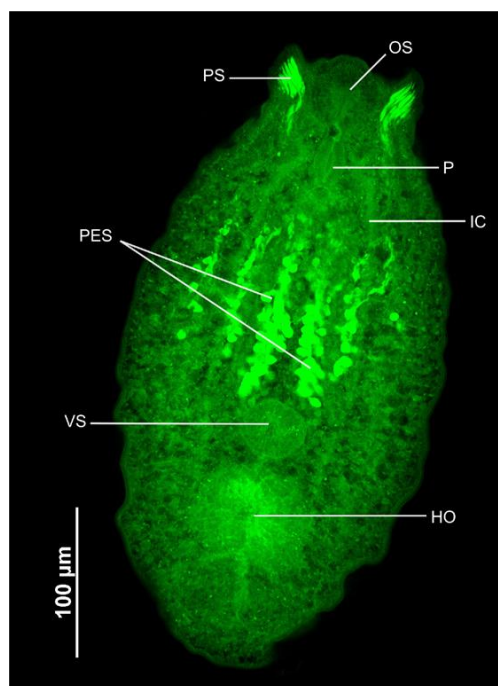
+/- kopējo plusu un mīnusu attiecība

Ar AM323 krāsotajos paraugos visa ķermeņa un piesūcekņu struktūra nebija skaidri novērojama. Uz parazītu virsmas tika vizualizēti dzelkšņi, bet ne to telpiskā struktūra. Vienlaicīgi visi trīs muskuļu slāņi tika vizualizēti tikai zem x600 palielinājuma nevis zem x100 kā tas bija ar AZPP luminoforu krāsotajiem paraugiem. Muskuļu slāņi piesūcekņos netika novēroti, tāpat kā netika vizualizēts teguments. Parazīta gremošanas sistēma: pre-rīkle, rīkle, barības vads un zarnas tika vizualizētas, bet netika novērotas skaidras robežas, kur sākas rīkle, kur barības vads, utt. No reproduktīvās sistēmas tika skaidri iezīmēts kopulācijas orgāns, olas un sēklinieki, bet olnīcas un dzemde netika novērotas.

Tā kā trematodes tika fiksētas sešos dažādos ķīmiskos fiksatoros un tika krāsotas ar diviem benzantrona luminoforiem, iegūtie rezultāti tika salīdzināti savā starpā, noskaidrojot visatbilstošāko fiksatora un luminofora savienību. Rezultāti apstiprināja, ka vispiemērotākā luminofora un fiksatora savienība *P. fasciolaemorpha* izpētei ar KLSM ir 70% etanols un AZPP vai AZPP un AFA šķīdums. Izstrādātais krāsošanas protokols, izmantojot sintezēto AZPP benzantrona luminoforu un KLSM, ir piemērots *P. fasciolaemorpha* izpētei, padarot krāsošanas protokolu mazāk darb un laukietilpīgu.

3.3.2. Saldūdens trematodes (III)

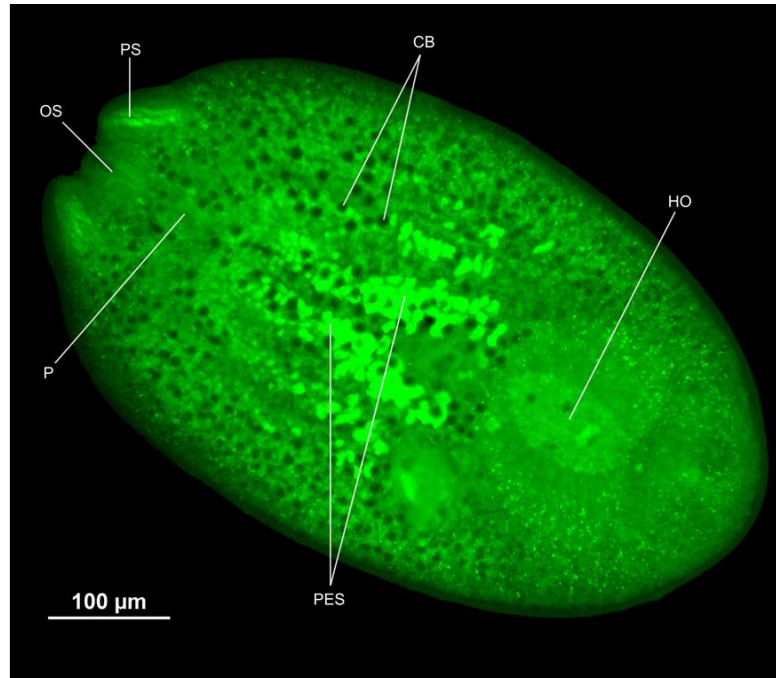
Pētījuma rezultāti apstiprināja, ka AM1, AM2, AM4, AM16 un P8 (izšķīdināti etanolā ar molāro koncentrāciju 10^{-5} M) ir piemēroti dzīvnieku izcelsmes paraugu izpētei ar KLSM. Mijiedarbojoties ar bioloģiskiem objektiem benzantronu luminofori vispirms saistās ar lipofīliskām substancēm, tāpēc pirmā saistība ar luminoforu ir novērojama šūnas hidrofobiskajā daļā – membrānā. *D. spathaceum* mtc. fiksēti 96% etanolā mikroskopiskās izpētes rezultāti norādīja uz visu pētāmo luminiscento luminoforu piemērotību trematodes izpētei. *D. spathaceum* sugas paraugiem bija novērojams iegarens vai ovāls ķermenis. Lielākoties visiem mtc. paraugiem tika novērota gremošanas sistēma. Vēdera piesūcekņis atradās ķermeņa vidū. Zem vēdera piesūcekņa tika novērots relatīvi liels skoleks - piestiprināšanās orgāns. Mutes piesūcekņis atradās ķermeņa priekšgalā un turpinājās muskuļotā rīklē. No rīkles līdz skoleksa beigām sniedzās divi zarnu zari (skat. 17. attēlu).



17. attēls. *Diplostomum spathaceum* (mtc.) krāsots ar AM16 (Mežaraupe, 2018).
OS – mutes piesūcekņis; PS – pseido piesūcekņis; P – rīkle; IC – zarnu zars; VS – vēdera piesūcekņis; HO – skoleks; PES – primārā ekskretorā sistēma

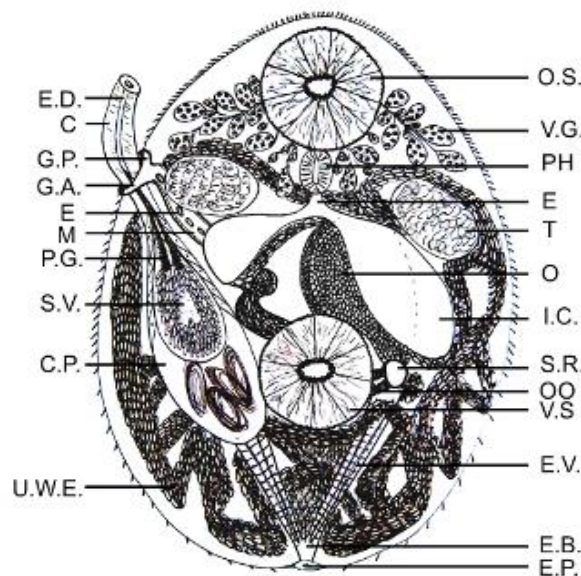
Katrā mutes piesūcekņa pusē tika novērots labi attīstīts pseido piesūcekņis. Tika novērota primārā ekskretorā sistēma (skat. 17. un 18. attēlu). Dažos trematodes paraugos tika novērots liels skaits noapaļoti kaļķainie ķermeņi, kas sākās pie mutes piesūcekņa un beidzās pie skoleksa (skat. 18. attēlu). No vienas puses visas krāsotās *D. subclaviatus*

trematodes kopā ar Karnoja fiksēšanas šķīdumu uzrādīja detalizētākus datus, iezīmējot sīkus, taksonomiski nozīmīgus skeleta elementus, tāpat kā mutes un vēdera piesūcekni, piestiprināšanās piesūcekņa dobumu. No otras puses, paraugos nebija novērojami iekšējie orgāni un struktūras, pat mainot skenēšanas iestatījumus.



18. attēls. *Diplostomum spathaceum* (mtc.) krāsots ar AM2 (Rubeniņa, 2018).
OS – mutes piesūceknis; PS – pseido piesūceknis; P – rīkle; HO – skoleks; CB – kaļķu
ķemenīši; PES – primārā ekskretorā sistēma

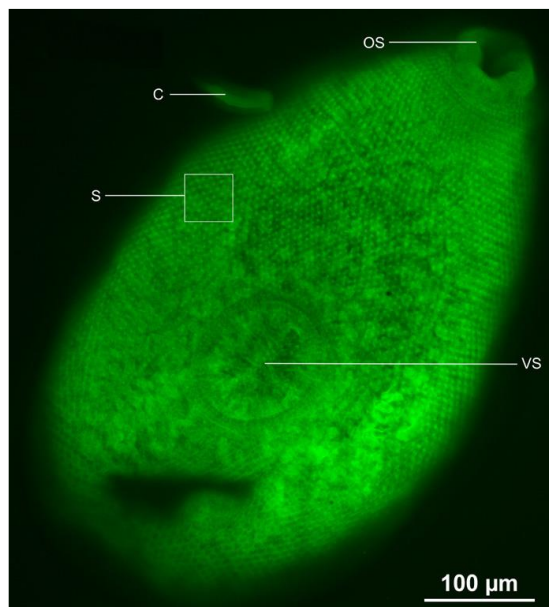
Benzantrona krāsvielas apvienojumā ar AFA šķīdumā fiksētiem paraugiem, uzrādīja *P. confusus* iekšējās un ārējās struktūras, iegūstot detalizētus parazitā orgānu attēlus. Balstoties uz iegūtajiem KLSM datiem, tika izveidots shematisks parazitā zīmējums (skat. 19. attēlu).



19. attēls. *Prosotocus confusus* shematisks zīmējums (Rubeniņa, 2020)

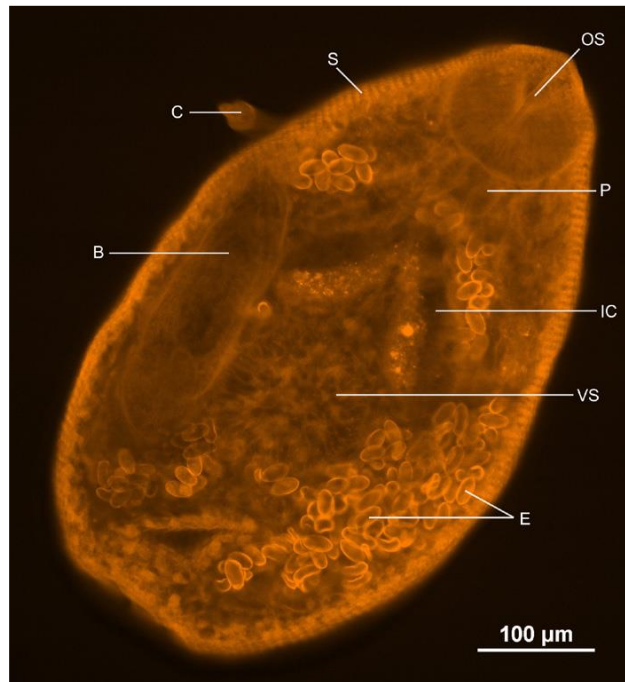
O.S. – mutes piesūceknis (acetabulums), V.G. – dzeltenuma dziedzeri, PH - rīkle, E – barības vads, T – sēklinieki, O – olnīcas, I.C. – zarnu dobums, S.R. – sēklas receptors, OO – ootips, V.S. – vēdera piesūceknis, E.V. – ekskrecijas vezikula, E.B. – ekskrecijas dziedzeris, E.P. – ekskrecijas pora, U.W.E. – dzemde pildīta ar olām, C.P. – kopulācijas orgāna maisiņš, S.V. – sēklas pūslītis, P.G. – prostatas dziedzeris, M – metraterms, E - ola, G.A. – dzimumorgānu ārijs, G.P – dzimumorgānu pora, C – kopulācijas orgāns, E.D. – ejakulācijas kanāls

Ārējās struktūrās tika novērots, ka trematodes ķermenis ir ovālas – apaļas formas, kutikulu klāj dzelksnīši (āķīši) (skat. 20. attēlu).



20. attēls. Pieaudzis *Prosotocus confusus* krāsots ar AM1 (ārējā uzbūve) (Rubeniņa, 2018). S – dzelksnīši; OS – mutes piesūceknis; VS – vēdera piesūceknis; C – kopulācijas orgāns

Tika novēroti divi vienāda izmēra piesūcekņi – mutes piesūcekņi ķermeņa priekšgalā un vēdera piesūcekņi ķermeņa vidusdaļā. *P. confusus* trematodes paraugos tika vizualizēta gremošanas sistēma (skat. 21. attēlu).



21. attēls. Pieaudzis *Prosotocus confusus* krāsots ar AM1 (iekšējā struktūra) (Rubeniņa, 2018).

OS – mutes piesūcekņi, P – rīkle, IC – zarnu zars; VS – vēdera piesūcekņi; E – olīņas; S – dzelkšņi; B – cirrus maiss jeb bursa; C – kopulācijas orgāns jeb cirrus

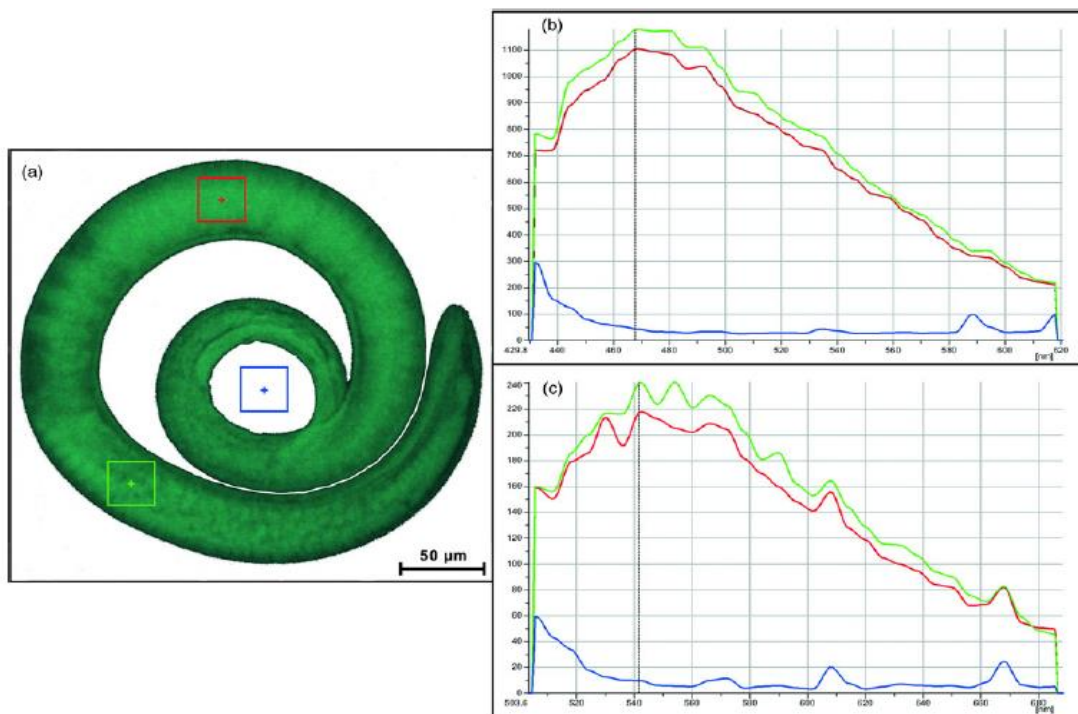
Tieši aiz mutes piesūcekņa tika vizualizēta rīkle, kas savienota ar barības vadu, kas paslēpts aiz olām. Barības vads sazarojās, veidojot divus zarnu zarus. Zarnas bija īsas un nerasniedza pat vēdera piesūcekņi. Pieaugušajiem parazītiem tika novērota reprodūktīvā sistēma. Tika novērots kopulācijas orgāns, kopulācijas orgāna maiss jeb bursa un visā parazīta ķermeņa garumā liels skaits olu. Olām tika novērota intensīva fluorescence.

3.4. *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru efektīva un ātra izpēte (II, IV) un dzimumu noteikšana (II)

Pētījuma laikā (II) tika apstiprināts, ka sintezētais benzantrons luminofors AZM ir piemērots *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru izpētei, kuri izolēti no saimnieka muskulatūras ar magnētiskā maisītāja metodi. Izmantojot sintezēto luminoforu un izstrādāto krāsošanas protokolu, rezultātā tika iegūti detalizēti dati, kuros bija novērojamas parazīta iekšējās un ārējās struktūras. Ķīmiskam fiksatoram bija ietekme detalizētu KLSM datu ieguvē. Fiksators tiek izmantots brīdī, kad parazīts tiek izdalīts no saimnieka muskulatūras un fiksēts. Pēc vairāku ķīmisko fiksatoru izmantošanas un iegūto

datu salīdzināšanas, rezultāti apstiprināja, ka izstrādātais krāsošanas protokols ir vispiemērotākais paraugiem, kas sākumā tikuši fiksēti Bouina šķīdumā.

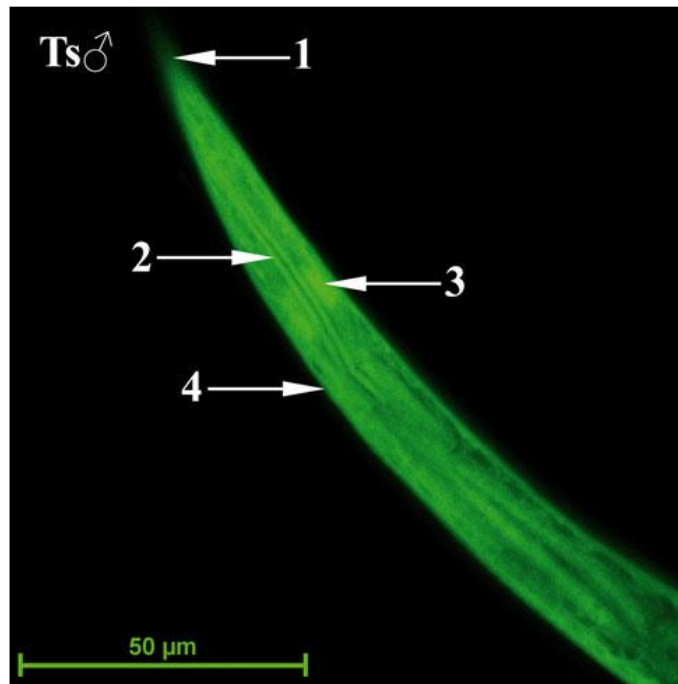
Dažādu viļņu absorbcija sniedz vairāk informācijas par luminoforu un pētāmo paraugu. Absorbcija pie 405 nm viļņu garuma sniedza detalizētākas krāsoto paraugu fluorescences un autofluorescences datus. Detalizēti rezultāti tika iegūti pie 488 nm absorbcijas, sniedzot vislabāko fluorescences/autofluorescences signāla attiecību. Tika veikts eksperiments, izvērtējot autofluorescences signāla ierosmi uz dažādiem viļņa garumiem. Pētot krāsotos trihinellas kāpurus, kas bija fiksēti Bouina šķīdumā (skat. 21. attēlu), tika mērīts autofluorescences spektrs 3 interesēs reģionus (no angļu val. *regions of interest* (ROI)).



22. attēls. Parauga autofluorescences bilde un autofluorescences grafiki, kas atbilst dažādiem absorbcijas viļņu garumiem (Mežaraupe, 2019). (a) Kāpura, kas fiksēts Bouina šķīdumā, autofluorescences bilde (405 nm absorbcija) parāda autofluorescences datus trim interesējošajiem reģioniem (ROI). Reģioni atbilst kāpura parauga dažāda veida audu tipiem (sarkanās un zaļās līnijas) un fonam (zilā līnija), (b) autofluorescences emisijas spektrs, kas atbilst 405 nm absorbcijai un (c) autofluorescences emisijas spektrs, kas atbilst 488 nm absorbcijai

Eksperimenta rezultāti apstiprināja, ka, izmantojot 488 nm lāzeri, ir iespējams sasniegt gandrīz 10 reizes autofluorescences vājināšanas signālu (atkarīgs no izmantotajiem ķīmiskiem fiksatoriem) salīdzinājumā ar 405 nm viļņu garuma absorbciju. Balstoties uz eksperimentos iegūtiem datiem, tika izlemts, ka šajā pētījumā tiks izmantots 488 nm viļņu

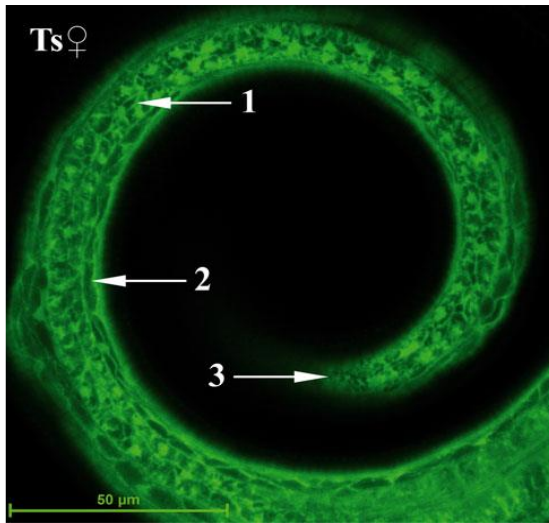
garums, maksimāli nomācot nevēlamo autofluorescences signālu. Izvēlētie viļņu garumi atrodas ārpus autofluorescences maksimuma absorbcijas robežas. Tika detalizēti izpētīts parazīta ķermenis, ieskaitot orgānu morfoloģiju un to izkārtojumu ķermenī. Tika novērots, ka parazītu kāpuriem bija raksturīgs nematodes kāpura ķermenis ar noapaļotu galvu un smailu astes daļu, tādējādi bija viegli atšķirams kāpura priekšējais un kaudālais gals. Parazīta priekšējais galvas gals, barības vads, nervu gredzens un kutikula ir atspoguļoti 23. attēlā.



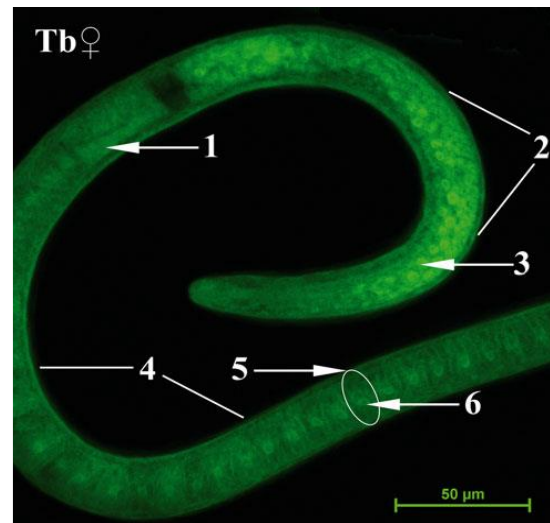
23. attēls. KLSM attēls ar *Trichinella* kāpura priekšējo galvas galu (Rubeniņa, 2019). Ts♂ - *Trichinella spiralis* tēviņš. 1 - priekšējais galvas gals, 2 - barības vads, 3 - nervu gredzens un 4 - kutikula

Iegūtie rezultāti parādīja augstu fluorescences signālu kutikulā. Salīdzinot iegūtos rezultātus starp *T. spiralis* un *T. britovi* parazītiem tika novērots, ka kāpuru kutikulas savā starpā atšķiras. *T. spiralis* kutikulā tika novērotas līnijas, kas, šķērsojot visu ķermeni, veido saucamo “pseudosegmentāciju”, bet *T. britovi* kāpuru kutikulā šādas līnijas netika novērotas, tā bija gluda. Kāpura aizmugurējais gals, nervu sistēma un hipoderma ir atspoguļota 24. attēlā. Izmantojot KLSM metodi, tika novērota hipoderma un tās *bacillary bands*. Parazīta viduszarna, stihosoms, dziedzeru šūnas (no angļu val. *stihocyte*), gremošanas sistēmas stihocītu kodols, dzimumorgānu aizmetnis un reproduktīvās sistēmas primārais oocīts ir redzams 25. attēlā. Turklāt, attīstītākos kāpuros tika novērots dzimumorgānu aizmetnis, ieskaitot sēkliniekus un dzemdes aizmetni.

Stihosoms aizņēma lielāko daļu ķermeņa aizmugurējā dobuma un to varēja ieraudzīt gandrīz visos paraugos. Dziedzeru šūnu kodolos tika novērota intensīva fluorescence.



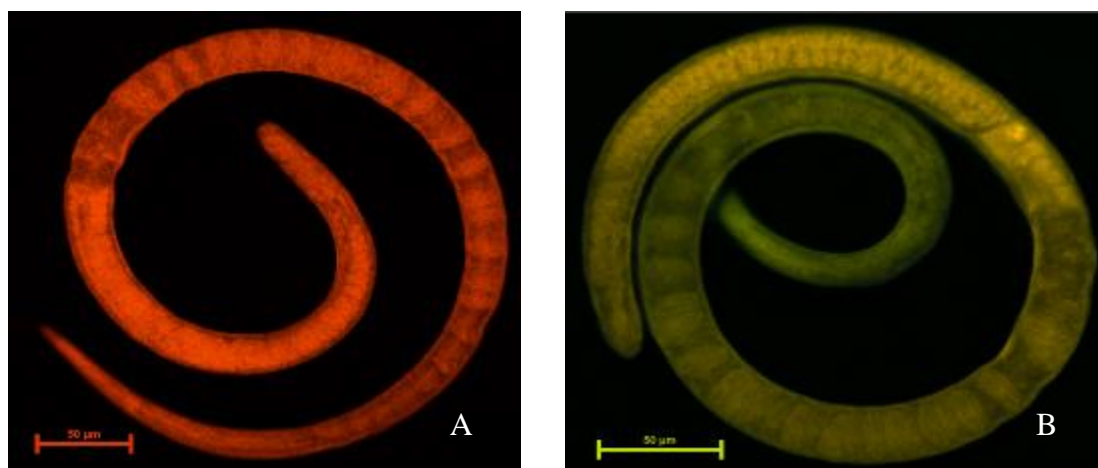
24. attēls. KLSM attēls ar trihinellas kāpura aizmugurējo galu (Rubeniņa, 2019). Ts♀ - *Trichinella spiralis* māfīte. 1 - nervu sistēma, 2 - hipoderma, un 3 - aizmugurējais gals



25. attēls KLSM attēls ar trihinella kāpura reproduktīvo un gremošanas sistēmām (Rubeniņa, 2019). 1 - viduszarna, 2 - dzimumorgānu aizmetnis, 3 - primārais oocīts, 4 - stihosoms, 5 - dziedzeru šūnas, and 6 - dziedzeru šūnas kodols

Pētījumā aprakstītais krāsošanas protokols ir piemērots kāpuru paraugiem, kas ilgāku laiku glabāti fiksatorā vai saldēti dzīvnieku muskulatūrā. Pētījuma laikā tika izmantoti *T. britovi* kāpuri, kas 1 līdz 5 gadus glabājās 96,6% etanolā vai glabājās sasaldētā dzīvnieku muskulatūrā. Primārajā paraugu apskatē ar gaismas mikroskopiju netika novērotas morfoloģiskas izmaiņas starp etanolā glabātiem un sasaldētā dzīvnieku muskulatūrā glabātiem parazitāriem paraugiem. Tomēr, izmeklējot paraugus ar KLSM, atklājās, ka vecākos paraugos (3 gadi <) ir novērojama morfoloģiskās struktūras degradācija.

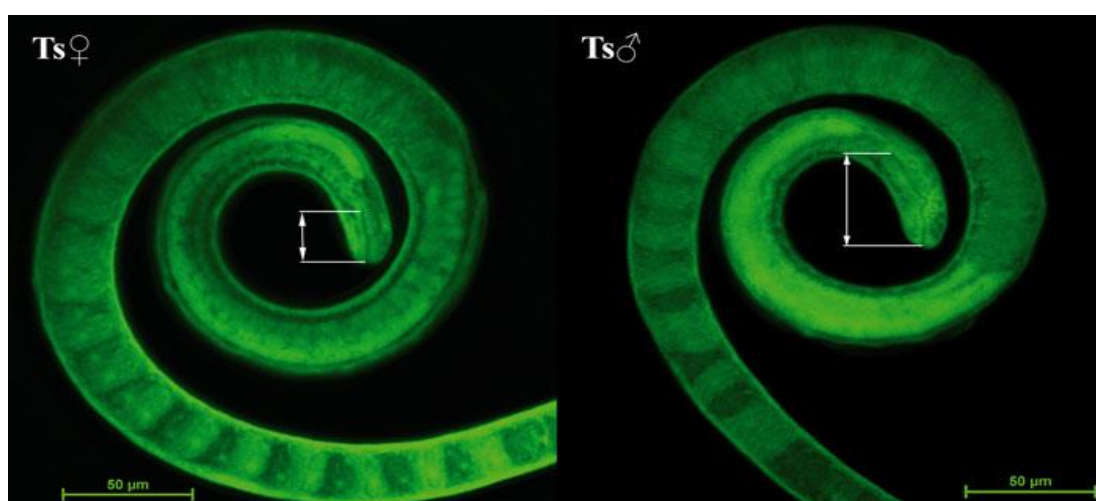
Neskatoties uz faktu, ka sintezētajam luminoforam P13 fluorescence tika ierosināta pie 432-441 nm, mijiedarbībā ar bioloģiskajiem objektiem tika novērota absorbcijas dislokācija uz augstākiem garo viļņu reģioniem, salīdzinot ar tīriem šķīdinātājiem, šajā gadījumā ar 561 nm. *T. britovi* izpētei tika izmantots 561 nm viļņu garums (skat. 26A. attēlu). Tika novērota spilgta luminiscence māfītes dzemdes aizmetnī.



26. attēls. *Trichinella britovi* (Rubeniņa, 2018): A – fluorescence, lāzera viļņa garums $\lambda = 561$ nm; B – fluorescence, lāzera viļņa garums $\lambda = 488$ nm un $\lambda = 561$ nm

Tā kā iegūto datu kvalitāte neatbilda vēlamajam, tad tika izmēģināts lietot divus lāzerus vienlaicīgi. Pēc vairākiem mēģinājumiem, eksperimentējot ar lāzera intensitātēm, skenēšanas ātrumiem, optiskā griezumuma biezumu, tika iegūti dati, apstrādājot paraugus ar diviem lāzeriem vienlaicīgi (skat. 26B. attēlu).

Izmantojot AZM luminoforu, tika izstrādāts krāsošanas protokols, kas ir piemērots trihinella kāpuru dzimuma noteikšanai, balstoties uz gala zarnas garuma mērījumiem (skat. 27. attēlu) (II). Pētījuma laikā tika mērīti gala zarnas garumi gan *T. spiralis*, gan *T. britovi* tēviņiem un mātītēm. Rezultātā tika iegūts, ka mātītēm vidējais gala zarnas garums bija *T. britovi* $21,19 \mu\text{m} \pm 2,45$ SD un *T. spiralis* $20,55 \mu\text{m} \pm 1,48$ SD, un tēviņiem vidējais gala zarnas garums bija *T. britovi* $41,08 \mu\text{m} \pm 4,26$ SD un *T. spiralis* $46,08 \mu\text{m} \pm 2,95$ SD.



27. attēls. KLSM attēlā atzīmēta gala zarna gan trihinella mātītei, gan tēviņam (Rubeniņa, 2019). $Ts_{\text{♀}}$ - *Trichinella spiralis* mātīte, $Ts_{\text{♂}}$ - *Trichinella spiralis* tēviņš. Ar \leftrightarrow atzīmēta gala zarna

4. DISKUSIJA

Pētījuma gaitā tika izmantoti deviņi DU sintezēti benzantrona luminofori parazitū efektīvai un ātrai izpētei: AM323 un AZPP tika izmantoti trematodes klases *P. fasciolaemorpha* parazitū sugu izpētei (I), AZM tika izmantots Nematoda tipa *T. spiralis* un *T. britovi* parazitū sugu izpētei un kāpuru dzimumu noteikšanai. Jāņem vērā, ka parazitū tika ievākti kopā ar dzīvnieka muskulatūru, dienas laikā parazitā kāpuri tika izdalīti no dzīvnieku muskulatūras un tika fiksēti piecos dažādos ķīmiskos fiksatoros (II). AM1, AM2, AM4, AM16 un P8 tika izmantots saldūdens trematodes *D. spathaceum* (mtc.), *D. subclaviatus* (ad.) un *P. confusus* (ad.) izpētei (III). P13 tika izmantots *T. britovi* parazitū sugu izpētei. Parazitā kāpuri tika uzglabāti 96,6% etanolā vai tie bija sasaldēti (-20°C temperatūrā) dzīvnieku muskulatūrā (IV).

Mūsdienās bioloģisko objektu krāsošana ar luminoforiem, kas balstīta uz organisko molekulu luminiscenci, ir kļuvusi par neaizstājamu rīku audu, orgānu un organismu struktūras vizualizēšanai. Spekrālās izmaiņas, kas novērojamas, luminoforiem saistoties ar šūnu struktūrām ir būtisks audu, orgānu un/vai organismu izpētē. Luminoforu izmantošana bioloģisko objektu krāsošanai, pierāda, ka ir jāmeklē jauni savienojumi un ir jāsintezē jauni luminofori ar plašāku ierosmes un emisijas spektru. Tāpēc ar vien lielāka uzmanība tiek pievērsta jaunu luminoforu izstrādei, sintēzei un to īpašībām. Tomēr, jaunu luminoforu sintēze nav tik vienkārša, jo tiem ir jābūt ar zemu toksicitāti uz bioloģiskiem objektiem. Pēc zinātniskās literatūras datiem ir atrodamas vairākas Trematoda krāsošanas metodes, kā piemēram, Govera karmīns (no angļu val. *Gower's carmine*) (Gover, 1939), Ehrlich hematoksilīns un Celestīna zilais-b (no angļu val. *Celestin blue-b*) (Roberts et al., 2012), aktīva anti-viela vai fluoroscējošā falloīdīna krāsviela (Mair et al., 1998; Kumar et al., 2003; Terenina et al., 2020). Benzantrona luminoforiem piemīt augsta lipofilitāte (Zhytniakivska et al., 2014a), kā rezultātā luminofori var tikt izmantoti amiloido fibrillu izpētē (Zhytniakivska et al., 2014b; Vus et al., 2012, 2014a,b), membrānu un proteīnu izpētē (Trusova et al., 2012; Ryzhova et al., 2016). Kalnina et al. (2007) izmantoja benzantrona luminoforu ABM limfocītu funkcionālās aktivitātes pētīšanai. Iepriekšējos pētījumos tika apstiprināts, ka benzantrons (3-N-2-[4-(2 feniletil)piperazin-1-il]acetamidobenzantrons (AZP5) ir piemērots helmintu glabāti 96% etanolā morfoloģiskai izpētei (Kirjusina et al., 2018). Turklāt, tika ziņots, ka benzantrona luminofori var tikt izmantoti kallusa embrija šūnu vizualizēšanai (Kirilova et al., 2019). Pētījumu laikā iegūtie rezultāti (Kirjusina et al., 2018; Kirilova et al., 2019) apstiprināja, ka ir vajadzība turpināt darbu pie jaunu

luminoforu sintēzes, paplašinot KLSM iespējas, tāpēc tika turpināts darbs pie benzantrona luminoforu sintezēšanas Trematoda un Nematoda efektīvai un ātrai izpētei.

Benzo[de]antracēn-7-ona luminofori, zinātniskā literatūrā biežāk lietots to saīsinājums – benzantroni, ir poliaromātiski hidrofobiskas substances (Kirilova et al., 2002, 2008). Tā kā planārās struktūras un molekulu lipofilitātes dēļ benzantronu luminofori mijiedarbojas ar membrānas lipīdiem, mūsdienās benzantroni ar vien biežāk tiek izmantoti kā fluorescentie luminofori dažādos bioloģiskos pētījumos (Shivraj et al., 2018). Šajā kontekstā tika sintezēti jauni benzantronu luminofori, kas vizualizētu šūnas membrānu, krāsai lokalizējoties membrānas lipīdos (**I, II, III, IV**). Benzantronu luminoforiem ir vairākas fotofizikālās īpašības, kā piemēram, fotofiziskais parametrs Stoksa nobīde, augsts absorbcijas koeficients, zema fluorescences intensitāte buferšķīdumos un augsta luminiscences jutība pret apkārtējās vides īpašībām (Kirilova et al., 2008, 2009; Gonta et al., 2013; Vus et al., 2014a,b). Visiem sintezētajiem benzantrona luminoforiem tika veiktas spektrālās analīzes, kā piemēram, absorbcijas spektrs, līdzsvara stāvokļa fluorescences spektrs, Stoksa nobīde, solvatofluorohromiskās maiņas un emisijas spektri. Visos organiskajos šķīdinātajos tika novērota spilgta emisija, no zaļās krāsas nepolārajā vidē līdz sarkanai fluorescences polārajā vidē, tādējādi parādot pozitīvu solvatofluorohromismu, jutību uz vides polaritāti, kas izriet no šķīdinātāja relaksācijas ierosinātā stāvokļa, ko pēc ierosmes izraisa luminofora dipola maiņa (**I, II, III, IV**). Tomēr, lai gan tikuši izanalizēti vairāki benzantrona luminofori, meklējot potenciālo benzantronu, kas saistītos ar membrānas lipīdu bilateriālo slāni un polimēriem (Grabchev et al., 2001; Zhytniakivska et al., 2014), pētījumi vēl jo projām notiek. Piemeklējot atbilstošāko benzantrona luminoforu, tika noskaidrots, ka būtiska loma ir C-3 pozīcijā esošajam aizvietotājam, kas savā ziņā nosaka luminofora efektivitāti, atklājot strukturālo un vides ietekmi uz fotofizikālajiem parametriem. Sintezētajiem luminoforiem ir plašs polaritātes diapazons (Kapusta et al., 2003; Siddlingeshwar et al., 2011; Shivraj et al., 2018), līdz ar to luminoforus var izmantot dažādu bioloģisku struktūru vizualizēšanai (Kalnina et al., 2007; Trusova et al., 2012; Ryzhova et al., 2016; Kirjusina et al., 2018; Kirilova et al., 2019).

Izmantojot benzantrona luminoforus ir jāņem vērā fotoizbalēšanas process, kura laikā fluorofors pamazām izzūd, tādējādi, pētāmā parauga kvalitāte sarūk ar katru reizi, kad uz to iedarbojas ar lāzeri (Han et al., 2021). Demchenko (2020) uzskata, ka fotoizbalēšana būtu jāuzskata par luminoforu galveno īpašību, jo no tās ir atkarīgs cik ilgi var analizēt paraugu un cik detalizēti dati tiks iegūti. Pētījumos (**I, II, III, IV**)

apstiprinājās, ka detalizētu rezultātu iegūšanai, ir ieteicams lietot lāzera viļņa garumus dilstošā secībā. Pieaugot lāzera intensitātei, struktūras tiek labāk vizualizētas, tomēr, izmantojot maksimālo lāzera jaudu, paraugs ātrāk kļūst neizmantojams fotoizbalēšanas dēļ. Optimālākie KLSM dati tika iegūti, analizējot paraugus pirmajā mikroskopiskās izpētes reizē. Veicot paraugu analīzi tiem pašiem paraugiem otru reizi, datu kvalitāte bija zemāka. Analizējot tos pašus paraugus jau trešo reizi, vairs netika novērotas pilnībā visas tās pašas pirmajā analīzes reizē novērotās detalizētās struktūras. Tas liek secināt, ka ar benzantrona luminoforiem krāsotie un KLSM sagatavotie paraugi ir piemēroti ātrai un efektīvai parazitū sugu izpētei.

Promocijas darbā izvirzītā hipotēze, ka dažādu parazitū sugu efektīvai un ātrai izpētei ir piemērots noteikts krāsošanas protokols, izmantojot specifisku benzantrona luminoforu un konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju, tika apstiprināta. Pētījuma rezultātā tika izstrādāti noteikti krāsošanas protokoli gan Trematoda parazitū sugu paraugiem (**I, III**), gan Nematoda parazitū sugu paraugiem (**II, IV**). Turklāt, protokoli ir piemēroti dzīvnieku muskulatūrā esošiem, pēc tam no dzīvnieku muskulatūras izolētiem un fiksētiem trihinellas kāpuriem (**II**), trihinellas kāpuriem uzglabāti 96,6% etanolā 1-5 gadiem vai kāpuriem, kas sasaldēti dzīvnieku muskulatūrā 1-5 gadus (**IV**). Pie tam, ar izstrādātā krāsošanas protokola palīdzību ir iespējams noteikt trihinella kāpura dzimumu, izmantojot DU sintezēto benzantrona luminoforu AZM (**II**). Sintezētie benzantrona luminofori un izstrādātie krāsošanas protokoli ir paredzēti KLSM (**I, II, III, IV**).

Neskatoties uz to, ka mūsdienās plašāk tiek izmantotas molekulārās bioloģijas metodes, nosakot parazitū sugas un genotipus, tomēr tā tik un tā paliek tikai kā kvalitatīva metode nevis kvantitatīva. Parazitoloģiskajos pētījumos parazīta esamība ne vienmēr nozīmē augstu invāzijas intensitāti. Dažos gadījumos, invāzijas intensitātei ir lielāka nozīme uz invadētā saimnieka veselību nekā endoparazitū sugu daudzveidības esamībai (Shemshadi et al., 2017; Allan et al., 2020). No otras puses, lielāka parazitū sugu daudzveidība nodara lielāku kaitējumu saimniekam, jo parazīti patērē vai uzkrāj dažādus resursus, tādējādi radot lielāku bojājumu saimnieka organismam (Swislocka et al., 2021). Jebkurā gadījumā, apvienojot gan mikroskopisko, gan molekulāro metožu rezultātus par infekciju intensitāti, parazitū dzimumu, parazitū vecumu, invadēto sugu daudzveidību, saimnieku apkārtējās vides apstākļiem, u.c., tiek iegūts ticams pārskats par pētāmās populācijas veselības stāvokli un parazitū transmisijas riskiem starp dzīvniekiem un cilvēkiem.

4.1. Trematodes (I, III)

Pētījuma laikā tika izvēlētas trematodes klases parazītu sugas. *P. fasciolaemorpha* (ad.) no homoterma saimnieka (I), kur parazīts lokalizējas saimnieka aknās. Tika izvēlētas trīs parazītu sugas no poikilotermiem saimniekiem: *D. spathaceum* (mtc.) lokalizējas zivs (otrais starpsaimnieks attīstības ciklā) acs lēcā, acs tīklenē un stiklveida ķermenī; *D. subclaviatus* (ad.) un *P. confusus* (ad.) lokalizējas bezastaino abinieku (definitīvais saimnieks) gremošanas sistēmā (III). Visas izvēlētas trematodes parazītu sugas ir endoparazīti un endoparazīti ir nozīmīgs faktors, kas ietekmē savvaļas populāciju dinamiku (Kołodziej-Sobocinska et al., 2019). Vēl jo vairāk augsta invāzijas intensitāte un plaša parazītu sugu daudzveidība var būtiski ietekmēt saimnieka veselības stāvokli (Filip-Hutsch et al., 2021).

Alnis (*Alces alces*) ir lielākais briežu dzimtas pārstāvis un ir nozīmīgs medījuma dzīvnieks (Świslocka et al., 2020). Aļņiem esot raksturīga augsta uzņēmība pret parazitārām slimībām, tāpēc lielāku invāziju rezultātā aļņu populācijas izmaiņas var ietekmēt ekosistēmas struktūru un darbību (Filip-Hutsch et al., 2020). Savukārt, saldūdens trematodes ietekmē abinieku un zivs sugu populācijas dinamiku, protams, sava loma ir starpsaimniekiem, kas veicina parazītu izplatīšanos ūdenstilpnēs. Piemēram, *D. spathaceum* izraisītā diplostomoze tiek raksturota kā ekonomiski nozīmīga akvakultūrā, jo lašu dzimtas zivis esot visjutīgākās pret šo slimību (Sweeting, 1974, Briede & Kirjušina, 2018).

Pētījuma eksperimentālie rezultāti (I) parādīja, ka, izmantojot 488 nm (ar 500-655 nm filtru) lāzera ierosmi, bija iespējams sasniegt 23x mazāku autofluorescences signālu, salīdzinājumā ar 405 nm (ar 425-580nm filtru) viļņa garuma ierosmi. Izvērtējot autofluorescenci, tika izvēlēti dažādi ROI un izvēlētie ROI tika salīdzināti ar fona ROI. Balstoties uz iegūtiem datiem, 488 nm lāzeris ar FITC filtru (500-550 nm) un 638 nm lāzeris ar Cy5 filtru (662-737nm) bija vispiemērotākie lāzeri nevēlamas autofluorescences nomākšanai. Savukārt, pētījumā ar saldūdens trematodēm (III) netika izmantots lāzeris ar 405 nm viļņa garumu, jo tas ierosina paraugu autofluorescenci. Iepriekšējos pētījumos benzantronu luminoforu lokalizēšanās modeļu membrānās tika atklāta pēc Förster rezonanses enerģijas pārnese un sarkanās malas absorbēšanas maiņas (Zhitniakivska et al., 2014; Ryzhova et al., 2016). Iegūtie rezultāti parādīja, ka augstās lipofilitātes dēļ P8 var iekļūt membrānas hidrofobiskajos reģionos. Luminofors P8 atrodas fosfolipīdu galvas reģionā, lai gan citas luminofora saistīšanās vietas bija tuvāk

membrānas virsmai. Ryzhova un līdzautori (Ryzhova et al., 2016) apstiprināja, ka krāsām AM2 un AM4 piemīt zemāka lipīdu saistīšanās spējas nekā P8 (**III**).

Tika novērota neliela maksimālā luminiscences pīķa nobīde. Ir svarīgi atzīmēt, ka katra organisma šūnai piemīt autofluorescence spektra zilā – dzeltenā reģionā, jo saskarsme ar tādiem fluoroforiem kā proteīnu saturošās aromātiskās aminoskābes, nikotinamīda adenīna dinukleotīda fosfāta reducētās formas, flavīni un lipopigmenti var veidot pīķa nobīdes (Monici, 2005). Pētījuma gaitā sintezētie benzantrona luminofori uzrādīja fluorescenci sarkanā spektra reģionā, tomēr krāsotiem paraugiem bija fluorescences nobīde īsāka viļņa reģionā (**I, III**). Tas varētu būt hidrofobiskāku apstākļu dēļ (lielāks lipīdu skaits, dehidratēšana ar etanolu). Blakus luminiscenci var radīt ķīmiskais fiksators. Piemēram, izmantojot formalīnu saturošu ķīmiskā fiksatoru sajaukumu, var tikt novērota intensīvāka šūnu luminiscence spektra dzeltenī - zaļā reģionā (Alfano et al., 1984).

Izstrādājot krāsošanas protokolu, iegūtie rezultāti apstiprināja, ka dehidratēšanas solis ir būtisks, jo liekā ūdens klātbūtne šūnas struktūrās neļauj iegūt atbilstošu parauga caurspīdīgumu. Šigins (no angļu val. *Shigin*) (Shigin, 1996), krāsojot trematodes tikai gaismas mikroskopijai, veica dehidratēšanas soli un arī pētījuma (**I, III**) rezultāti apstiprināja dehidratēšanas nozīmīgumu jaunā protokola izstrādē, izmeklējot paraugus ar KLSM metodi. Pētījuma rezultāti parādīja, ka parazitāriem ar plānu apvalku struktūru, piem., Diplostomatidae dzimtai (**III**), nav vajadzības pielietot papildus dzidrināšanas soli, izmantojot 100% ksilēnu, jo absolūtais ksilēns var deformēt jutīgāku paraugu struktūru. No otras puses, parazitāriem ar plānu apvalku, it īpaši ar kutikulas dzelksnīšiem papildus dzidrināšana nav obligāta, tomēr šis solis uzlabo iekšējo struktūru un orgānu vizualizēšanu. Pētījuma laikā (**I**) tika novērots, ka trematodes biezums nosaka, cik ilgi paraugs jātur 100% ksilēnā, jo biezāka trematode, jo ilgāk tā tika turēta ksilēnā. Novērojums tika iekļauts izstrādātajā krāsošanas protokolā, kur norādīts, ka *P. fasciolaemorpha* tiek turēts etanola:ksilēna šķīdumā 8-10 min, pēc tam 100% ksilēnā 30s – 3 min, šādas variācijas laikus ir pamatotas ar dažādos parazitāru paraugu biezumu.

Homotermo saimnieku parazitāriem ir biezāki apvalki nekā poikilotermo saimnieku parazitāriem, jo homotermiem saimniekiem ķermeņa temperatūra nav atkarīga no apkārtējās vides temperatūras. Nemainīgu ķermeņa temperatūru nodrošina termoregulācija, kas ietver gan ķīmiskos un fiziskos procesus, gan uzvedības izmaiņas, kā rezultātā parazitāram ir jāpielāgojas saimnieka termoregulācijas īpašībām, veidojot biezāku ārējā apvalka slāni (tegumentu) (Poulin, 1998). Šī īpatnība tika ņemta vērā, kā

rezultātā *P. fasciolaemorpha* paraugiem izstrādātais protokols ietver parauga turēšanu luminoforā 15 minūtes, bet saldūdens trematodes krāsošanas protokolā paraugs luminoforā jātur 10 minūtes.

KLSM ir būtiska metode bioloģijas pētījumos un tā kļūst arvien nozīmīgāka arī medicīnas pētījumos, piem., vēža diagnostikā (Durko & Maļeckā-Panas, 2015). KLSM tiek plaši pielietota dažādu sugu morfoloģiskās un fizioloģiskās struktūras izpētē, it īpaši fiksētiem trematodes paraugiem. Vēl jo vairāk, dažādie pētījumi un mēģinājumi uzlabot dažādu luminoforu īpašības, sniedz iespējas vizualizēt parazīta ķermeņa virsmas morfoloģiskās pazīmes, dažādu trematodes sugu pieaugušu un kāpuru stadijas orgānu sistēmas, it īpaši gremošanas un reproduktīvo sistēmu. Plakantārpu parazītu sistemātiskie pētījumi tiek vērsti uz detalizētu struktūru izpēti pat uz virsmas esošām barības vielu atverēm, reproduktīvo sistēmu, ekskrecijas sistēmu un dziedzeriem, iespējamo jutības orgānu funkcijām un to izkārtojumu uz virsmas, trematodes dzelksnišu forma un izkārtojumu veidiem (Jurberg et al., 2008; Borges et al., 2017). Souza un viņas līdzautori (Souza et al., 2011) izmantoja hidrohlorisko karmīnu un ar KLSM metodi vizualizēja trematodes reproduktīvo sistēmu. Vēlāk Souza un līdzautori (Souza et al., 2013) aprakstīja metacerkāriju iecistēšanos, aktivizēšanos, cistas noārdīšanos un izšķīlšanos, izmantojot KLSM. Iepriekšējie pētījumi apstiprināja, ka benzantrona luminofori spēj iekrāsot bioloģisku materiālu (Kalnina et al., 2007; Trusova et al., 2012; Ryzhova et al., 2016), tāpēc tika nolemts pētīt tālāk vai benzantroni spēj iekrāsot citus bioloģiskos objektus izpētei ar KLSM metodi.

Trematodes hermafrodīta paaudzei ir raksturīga ķermeņa sienas muskulatūras uzbūve, kas sastāv no trīs slāņiem: gredzeniskā, šķērsvītrotā un diagonālā (Ginetsinskaya, 1988; Galaktionov & Dobrovolskij, 2003). Tikai retos gadījumos ir atrodami taksoni, kur specializācijas dēļ kāds no slāņiem nav vai tas ir aizstāts ar kādu citu. Piemēram, *Strigeidea* diagonālo muskuļu šķiedru slānis ķermeņa pakaļējā daļā ir aizstāts ar gredzenisko muskuļu slāni, kas nozīmē, ka trematodei ķermeņa pakaļējā daļā ir divi gredzenisko muskuļu slāņi (Stewart et al., 2003a,b,c). Tomēr izmantotā pētījuma materiālā (**I**, **III**) bija novērojami visi trīs raksturīgākie trematodes ķermeņa sienas muskulatūras slāņi. Iespējams, ka, modificējot krāsošanas protokolu, būtu iespējams novērot arī citas muskuļu šķiedru grupas, jo pašlaik izstrādātais protokols nav vērsts uz kādu konkrētu orgānu sistēmu vai skeleta muskulatūras slāni. Pēc zinātniskās literatūras datiem ir vairāk nekā 20 *Digenea* sugas pētījumi, kur pētnieki vai pētnieku grupas ir mēģinājuši rekonstruēt muskuļu sistēmu. Trematodes izmeklējumos papildus trīs

klasiskajiem muskuļu slāņiem ir novēroti priekšējās mediālās, mugurējās radiālās, priekšējās laterālās un U veida muskuļu šķiedras (Mair et al., 1998, 2000, 2003; Stewart et al., 2003a,b,c; Šebelova et al., 2004; Bulantova et al., 2011; Collins et al., 2011; Petrov & Podvyaznaya 2016). Tā kā papildus ķermeņa sienas muskuļu grupas, visticamākais, evolūcijas ceļā ir izveidojušās vēlāk nekā trīs galvenās muskuļu grupas un tās tiek atrastas sugās no tālākiem taksoniem, tad tās nevar uzskatīt par šauras specializācijas rezultātu (Galaktionov & Dobrovolskij, 2003).

Muskuļu slāņu pētījumiem tiek izmantotas samērā sarežģītas krāsošanas metodes, kā piemēram, Krupenko (2014) kā fiksatoru izmantoja 4% paraformaldehīda šķīdumu PBS un *D. subclaviatus* krāsoja ar TRITC konjugētu falloidīnu. Falloidīns piesaistās pie aktīva polimēriskajām un oligomēriskajām formām (Oda et al., 2005). Fluorescentā aktīva standarta krāsošanas protokols kopā ar KLSM trematodes muskuļu sistēmas izmeklēšanai ir ticis izmantots vairākkārt (Mair et al., 2003; Šebelova et al., 2004; Bulantova et al., 2011; Krupenko & Dobrovolskij, 2015; Petrov & Podvyaznaya 2016; Krupenko & Dobrovolskij, 2018; Krupenko, 2019). Parauga sagatavošana šajā gadījumā prasa vienu vai pat vairāk kā divas dienas, bet rezultātā tiek iezīmētas vissīkākās muskuļu šķiedras, tādējādi izceļot sugas raksturīgākās pazīmes. Mūsdienā straujajā dienas ritējumā divas dienas ir pārāk ilgs laiks, tāpēc tika meklētas iespējas izstrādāt specifisku krāsošanas protokolu, kas tērētu mazāk laika un cilvēka stundu resursu, bet sniegtu detalizētus rezultātus. Ar pētījumā izstrādātiem krāsošanas protokoliem (**I**, **II**, **III**, **IV**), rezultātus var iegūt jau pirmo divu stundu laikā. Uzsākot pirmos mēģinājumus krāsot saldūdens trematodes, iegūtajos rezultātos netika novērota visa ķermeņa muskuļu struktūra, tomēr tika iezīmēta muskuļotā rīkle, mutes un vēdera piesūcekņi (**III**). Savukārt, pētījumā ar *P. fasciolaemorpha* (**I**) tika novērota detalizētāka ķermeņa muskuļu struktūra, vizualizējot gredzeniskās, diagonālās un šķērssvītrotās muskulatūras slāņus. Ārējais gredzeniskais slānis bija strukturēts platās joslās, kas atradās paralēli viena otrai, turklāt iekšējais šķērssvītrotos muskuļu slānis veidoja vēl biezākas muskuļu joslas nekā gredzeniskais. Diagonālas muskuļu šķiedras bija sakārtotas tādos kā saišķos, turklāt muskuļi šķērsoja viens otru. Pētījumos (**I**, **III**) iegūtie rezultāti parādīja, ka sintezētie benzantrona luminofori un izstrādātie krāsošanas protokoli sniedza līdzīgus rezultātus kā krāsojot paraugus ar fluoresceīna izotiocianātu vai tetrametilrodamīna B izotiocianāts-konjugētu, kas iekrāso tieši aktīvu (Terentina et al., 2020). Salīdzinot iegūtos rezultātus (**I**) ar Kumar et al. (2003) rezultātiem, jānorāda, ka pētījumā tika novērots, ka diagonālo muskuļu slānī muskuļa šūnu ķermeņi bija pievienoti pie muskuļu šķiedrām. Tomēr,

pētījumu gaitā netika novēroti muskuļu šūnu ķermeņi ne šķērsvītroti, ne gredzenisko muskuļu slānī.

Trematodēm ir novērots dzelkšņiem klāts teguments (Rankin, 1939; Belopolskaya, 1963; Davies, 1979; Saville et al., 1997; Pina et al., 2011; Krupenko & Dobrovolskij, 2018, šī pētījuma dati (**I**)). Jau iepriekšējos pētījumos ir minēta tegumentālo dzelkšņu būtiskā nozīme kā kustību un pieķeršanās palīgorgānam (Bennett, 1975; Davies, 1979; Cohen et al., 1982). Ķermeņa priekšējo daļu pārklāj dzelkšņi ar lielāku zobojumu, bet ķermeņa lejasdaļā atrodami dzelkšņi ar mazāku zobojumu vai pat dzelksnis ar 2-3 virsotnēm (Køie, 1977). Ar KLSM tika novērots, ka ķermeņa priekšējā daļa ir blīvāk nosepta ar dzelkšņiem nekā ķermeņa apakšējā daļa (**I**, **III**). Lai gan Krupenko & Dobrovolskij (2018) secināja, ka dzelkšņu forma, zobiņu skaits utt. nav nosakāms tikai ar KLSM metodi, šī pētījuma rezultāti (**I**) apstiprināja pretējo. AZPP luminofors un KLSM metode sniedza informāciju par dzelkšņu izmēriem, zobiņu skaitu un to formu. Tā kā dzelkšņi pārklāj visu trematodes ķermeni tiem pavisam noteikti ir sava loma kustību un pieķeršanās funkcijās. Vēl jo vairāk, ir jābūt kādam spēkam, kas vada dzelkšņu saskari ar saimniekorganisma gļotādu. Visticamākais, šo spēku nodrošina ķermeņa sienas un dorsoventrālās muskuļu šķiedras, veicot ventrālo saliekšanos. Kā jau Krupenko & Dobrovolskij (2015) secināja, ka gan tegumenta dzelkšņi, gan muskulatūra ir pierādījumi par ķermeņa funkcionālo diferencēšanos. Tā ir diferencēšanās starp ķermeņa priekšējo daļu (preacetabuluma reģions) un aizmugurējo daļu (postacetabuluma daļa). Ķermeņa priekšējā daļa ir vairāk atbildīga par pieķeršanos saimnieka organismam par ko liecina spēcīgu tegumentālo dzelkšņu attīstība, ķermeņa sienas un dorsoventrālā muskulatūra.

Adhezīvo orgānu muskulatūra, piemēram, piesūcekņiem, lielākoties vienmēr ir ļoti kompleksa un sastāv no vairāk kā trim dažādiem muskuļu tipiem, kas veidojušies no ķermeņa sienas muskuļu slāņiem (Krupenko, 2019). Mair et al. (2000, 2003), Stewart et al. (2003a), Halton & Maule (2004), Bulantova et al. (2011), Collins et al. (2011), Petrov & Podvyaznaya (2016), Terentina et al. (2020) savos pētījumos ziņoja, ka mutes un vēdera piesūcekņos tikuši novēroti radiālie, ekvatoriālie (= gredzeniskie) un meridionālie (= šķērsvītrotie) muskuļu slāņi. Tomēr, lielākoties vienmēr pētījumu rezultātos trūkst detalizētas muskulatūras izkārtojuma apraksts. Arī šī pētījuma (**I**) rezultāti apstiprināja visu trīs raksturīgāko muskuļu slāņu esamību mutes piesūceknī. Krupenko (2019) apstiprināja, ka viņas pētījumā iegūtie dati par *Diginea* mutes piesūcekņu struktūru un muskuļu izkārtojumu apliecina, ka piesūcekņu uzbūve ir krietni vien sarežģītāka nekā ir

pieņemts domāt. Turklāt, standarta termini, kas apraksta piesūcekņu muskulatūru – radiālās, meridionālās, ekvatoriālās muskuļu šķiedras, izriet no pieņēmuma, ka piesūcekņi ir radiāli simetriski orgāns (Krupenko & Dobrovolskij, 2015). Tomēr, mutes piesūcekņu muskulatūras izkārtojumu ietekmē šādas pazīmes: 1) piesūcekņa bilaterālā simetrija, 2) galvenās ķermeņa ass un paša piesūcekņa ass neatbilstība, 3) piesūcekņa virsmas reģionalizācija. Samērā nesenos pētījumos par trematodes piesūcekņu muskulatūras izkārtojumu, tika piedāvāts izvairīties no “ekvatoriālās muskuļu šķiedras” termina lietošanas, jo tas bieži vien tiek izmantots kā sinonīms terminam “gredzeniskās muskuļu šķiedras”, kas veido mutes atvēruma sfinkteri (Mair et al., 1998; Stewart et al., 2003a; Petrov & Podvyaznaya, 2016). Lai gan dažos pētījumos tās sauktas par “ekvatoriālām” muskuļu šķiedrām, tās tomēr neparādās ķermeņa priekšgala piesūcekņī (Stewart et al., 2003a; Šebelova et al., 2004). Iespējams, ka aprakstītie muskuļi bijuši līdzīgi priekšējās malas muskuļu grupām. Mutes piesūcekņu muskulatūra, visticamāk, ir veidojusies no somatiskās muskulatūras (Mair et al., 1998; Halton & Maule, 2004). Tiek pieļauts, ka ārējās virsmas un mutes piesūcekņa atloces meridionālās muskuļu šķiedras, tāpat kā atloces aizmugurējās laterālās muskuļu šķiedras ir veidojušās no ķermeņa sienas gareniskās muskulatūras. Ārējās virsmas un piesūcekņa atloces šķērsvītrotās muskuļu šķiedras varētu būt veidojušās no ķermeņa sienas gredzeniskās muskulatūras. Dorsoventrālās muskuļu šķiedras ir gan parazītiskiem, gan brīvi dzīvojošiem plakantārpiem un tiek uzskatīts, ka tieši šis slānis nodrošina tārpu plakano formu (Mair et al., 1998; Tyler & Hooge, 2004; Bolanos & Litvaitis, 2009; Davila et al., 2010). Mugurējie muskuļu saišķi, iespējams, veidojusies no dorsoventrāliem muskuļu saišķiem. Diagonālās šķiedras, visticamāk, radušās no ķermeņa sienas diagonālās muskulatūras (Krupenko & Dobrovolskij, 2015, 2018; Krupenko, 2019). Daļa gareniskās un šķērsvītrotās muskuļu šķiedras, kas atrodamas vēdera piesūcekņa uzbūvē, ir savienotas ar mutes piesūcekni vai kādu no orgāniem ķermeņa priekšpusē. Iespējams, ka šie savienojumi ir regulē visa ķermeņa kustības. Šķērsvītrotie un krustu šķērseniskās muskuļu grupas kopā ar dorsoventrālajām muskuļu šķiedrām un ķermeņa sienas muskulatūru tiek izmantotas brīdī, kad ķermenis tiek ventrāli saliekts, tādējādi tiek regulēts spiediens visā ķermenī (Mair et al., 1998; Krupenko & Dobrovolskij, 2015). Šī pētījuma rezultāti (I) norādīja, ka gredzeniskās muskuļu šķiedras ir blīvāk izvietotas tieši kopulācijas orgānā un kopulācijas orgāna maisiņā, salīdzinot ar *Fasciola hepatica* (Mair et al., 1998). Kopumā iegūtie pētījuma rezultāti (I, III) apstiprināja vispārējo trematodes ķermeņa morfoloģiju pēc Skrjabin (1949).

Zem tegumenta esošajās parenhīmas šūnās tika novērotas glikogēna rezerves, visvairāk tieši dzeltenuma dziedzeru zonā. Izkaisītas glikogēna rezerves tika novērotas arī piestiprināšanās orgānos. Vissspilgtākā fluorescence tika novērota parazīta olās, kuras lielākoties sastāv no glikogēna un lipīdiem (I). Glikogēna rezerves un lipīdi kalpo par enerģijas avotu, šūnu aktivitātes regulatoru un to izmanto bioloģisko membrānu veidošanai (Swiderski et al., 2019).

Pētījumos tika izmantoti benzantrona luminofori ar trīs dažādām funkcionālajām grupām: aminobenzantrons (P8, III), amidinobenzantrons (AM1, AM2, AM4 AM16 III) un AM323 (I) un aminoamidobenzantrons AZPP (I), kas norāda, ka 3-aminobenzantrona 3. stāvoklī ir amino ar heterociklisku amido, amidino vai amino grupu. Luminoforu izvēle tika balstīta uz Kapusta et al. (2003), Siddlingeshwar et al. (2011), Shivraj et al. (2018) un Tarabara et al. (2021) pētījumiem, kur secināja, ka funkcionālā grupa nosaka luminofora efektivitāti, tādējādi, pieļaujot varbūtību, ka pētījuma rezultātus varētu ietekmēt benzantrona funkcionālās grupas. Kopumā iegūtie rezultāti (I, III) apstiprināja, ka vispārējo trematodes ķermeņa struktūru, dzelkšņus un piestiprināšanās orgānus var vizualizēt ar visām trim benzantrona luminoforu grupām. Tomēr, ķermeņa dimensionālo struktūru vislabāk iezīmēja tieši AZPP luminofors (I) ar amino un amido funkcionālo grupu. Krāsošanas protokols ar P8 luminoforu nav piemērots tegumenta vizualizēšanai. Izmantojot krāsu no aminobenzantrona grupas teguments tika novērots, tomēr iegūtie attēli nebija pietiekami detalizēti vai arī tie bija zemas kvalitātes (graudaini III). Salīdzinot rezultātus starp aminobenzantrona un aminoamidobenzantrona luminoforiem, tika secināts, ka detalizētāks teguments tika vizualizēts, izmantojot AZPP. Turklāt, tika novērota tegumenta sasaiste ar dzelkšņiem un visiem trim ķermeņa sienas muskulatūras slāņiem: gredzenisko, diagonālo un garenisko (I). Dažādu krāsu grupu izmantošana nemainīja gremošanas sistēmas detalizētu rezultātu iegūvi, varētu teikt, ka tie bija vienlīdz vienādi ar visām trim luminoforu grupām (I, III). Salīdzinot reproduktīvās sistēmas izpētes rezultātus *P. fasciolaemorpha* paraugiem, tika secināts, ka visdetalizētākie attēli tika iegūti ar AZPP luminoforu (I). Tomēr, pētījumā ar saldūdens trematodēm (III) arī AM1 un AM4 no amidinobenzantrona grupām vizualizēja reproduktīvo sistēmu un dzeltenuma dziedzerus.

Benzatronu luminofori var saistīties ar proteīniem, piemēram, ar cilvēka seruma albumīnu vai lizosomu amiloīdām fibrillām (Gorbenko et al., 2010; Ryzhova et al., 2016). Rozario un Newmark (2015) pētījums parādīja, ka lenteņa *Hymenolepis diminuta* nervu sistēma un citas sensorās struktūras tika iekrāsotas ar anti-sinapšu antiķermeņiem. Tāpat

kā citiem plakantārpiem, arī pieauguša *H. diminuta* tārpiem nervu sistēma sastāv no centrālās un perifērās daļas. Tika iekrāsotas divas nervu stiegras sānos, divi mediānie nervi un viens galvas ganglijs. Pētījumā izstrādātie krāsošanas protokoli (**I**, **III**) netika paredzēti kādas konkrētas orgānu sistēmas krāsošanai un vizualizēšanai, tāpēc tika pārbaudīts vai rezultātos ir redzama kāda daļa no nervu sistēmās. Iegūtajos rezultātos, krāsojot trematodes ar sintezētajiem AZPP, AM323, AM1, AM2, AM4, AM16 un P8 benzantronu luminoforiem, netika novērota neviena no nervu sistēmas daļām.

4.2. Nematodes (**II**, **IV**)

Pētījuma laikā tika izvēlētas *Trichinella* ģints parazītu sugas *T. spiralis* un *T. britovi*. Veicot jebkādas mikroskopiskās analīzes, būtiska nozīme ir parauga kvalitātei, kas ietekmēs turpmāko analīžu rezultātus. Pētījumā nozīme tika piešķirta ne tikai izvēlētajiem benzantronu luminoforiem un to iekrāsotajām struktūrām, bet arī paraugu uzglabāšanas apstākļiem. Pētījumā ar AZM benzantrona luminoforu (**II**) tika izvēlēti *T. spiralis* un *T. britovi* paraugi, kuri tika ievākti kopā ar dzīvnieka muskulatūru un dienas laikā tika izdalīti no dzīvnieku muskulatūras, pēc tam fiksēti četros dažādos ķīmiskos fiksatoros. Savukārt, pētījumā ar P13 benzantrona luminoforu (**IV**) tika izvēlēti *T. spiralis* paraugi, kur parazīta kāpuri tika uzglabāti 96,6% etanolā vai kāpuri tika saldēti dzīvnieku muskulatūrā. Abas trihinellu parazītu sugas ir cilvēkam un dzīvniekam bīstamās trihinelozes ierosinātājas (Rozycki et al., 2022; Tso et al., 2022). Visbiežāk helmintu rezervāri ir mājas un meža cūkas. Pašlaik helmintu ierosinātā slimība ieņem septīto vietu starp desmit bīstamāko un ekonomiski nozīmīgo pārtikas izcelsmes parazītiem, apdraudot miljoniem cilvēku visa pasaulē (Koohsar et al., 2021). Balstoties uz slimību profilakses un kontroles dienesta datiem 2021. gadā Latvijā tika reģistrēti 6 trihinelozes gadījumi, dati par 2021. gada decembri vēl nav pieejami (SPKC, 2022).

Trihinella ģintī ir aprakstītas 8 sugas un 4 unikāli genotipi, kas pašlaik iedalās divās evolucionāri nozīmīgās grupās, balstoties uz kolagēna kapsulas esamību vai neesamību. Morfoloģisko līdzību dēļ *Trichinella* sugas izolātus ir kļuvis ļoti grūti noteikt līdz sugas līmenim, līdz ar to gadu laikā ir attīstījušās vairākas bioķīmiskās un molekulārās metodes, tādējādi atvieglojot sugu un genotipu noteikšanu (Zarlenga et al., 2020).

Gandrīz visas šūnas un audi ir spējīgi fluorescēt tuvu redzamā spektra ultravioletajam starojumam. Lai pētītu sintezētos fluorescentos luminoforus, fluorescences signālam ir jābūt atdalītam no luminofora un autofluorescences signāla.

Vieglākais veids kā to izdarīt ir izvēlēties absorbcijai atbilstošo viļņa garumu. Parasti autofluorescences ierosmes reģions atrodas apmēram 400 nm un pētījumā tika izvēlēta 488 nm absorbcija (II), slāpējot autofluorescences signālu attiecībā pret marķiera fluorescences signālu (Schnell et al., 1999; Neumann & Gabel, 2002). Absorbcija pie konkrētā viļņa garuma sniedza vairāk informācijas par luminoforu un pētāmajiem paraugiem. Piemēram, absorbcija pie 405 nm deva labākus krāsoto paraugu fluorescences un autofluorescences attēlus. Absorbcija pie 488 nm deva labāko fluorescences/autofluorescences signālu attiecību. Līdzīgi kā ar trematodes paraugiem (I, III), trihinellas kāpuri tika fiksēti vairākos ķīmiskos fiksatoros un pēc tam tika pārbaudīts vai tie spēj ietekmēt KLSM rezultātus. Pētījums (II) atklāja, ka vispiemērotākais ķīmiskais fiksators no dzīvnieku muskulatūras izdalīto un fiksēto trihinellu kāpuriem, kuri pēc tam tiek pētīti ar KLSM, ir Bouina fiksators. Rezultātā tika iegūti detalizēti dati par kāpura morfoloģiju un tās izkārtojumu.

Trichinella ģints pētījumos KLSM lielākoties izmantota, pētot ekskretoro un sekretoro antigēnu (Li et al., 1999), imūnās atbildes (Bai et al., 2012), vai *T. spiralis* mijiedarbību muskuļu šūnās *in vitro* (Bai et al., 2011) un izmantota dažādos pētījumos, kur tiek izvērtēts patoloģiskais un/vai terapeitiskais efekts (Li et al., 1999; Masetti et al., 2004; Hao et al., 2014). Murata et al. (1998) izmantoja konfokālo mikroskopiju, pētot dziedzeru šūnas, to kodolu izplatību un izmērus gan trihinella kāpuros, gan pieaugušajos īpatņos. Pētījuma ietvaros izstrādātais krāsošanas protokols ir piemērots nesen ievāktiem, no dzīvnieku muskulatūras izdalītiem un fiksētiem kāpuru paraugiem, kas iegūti ar magnētiskā maisītāja metodi (II). Izstrādātie protokoli ir ātri un vienkārši (II, IV) salīdzinot ar zinātniskajā literatūrā aprakstītajiem krāsošanas protokoliem, kur paraugu sagatavošana sastāv no vairākiem soļiem, kur viens solis var ilgt pat vairākas stundas. Viena parazitā krāsošana, izmantojot pašreiz aprakstītos krāsošanas protokolus, var aizņemt vairākas stundas un procedūra ir piemērota specifisku parazitā sistēmu krāsošanai (Stewart et al., 2003a,b,c; Davila et al., 2010; Krupenko, 2014).

Zinātniskās literatūras datos vienmēr, veicot analīzi par kāpura morfoloģiju, tiek aprakstīti pētījumi ar trihinella parazitā kāpuru. Tēviņu no mātītes var atšķirt ar šādām morfoloģiskām pazīmēm: kāpura garums - tēviņiem vidēji 0,62 mm līdz 1,58 mm; mātītei – 0,71 mm līdz 3,35 mm; kāpura platums - tēviņiem - 25 μm līdz 38 μm; mātītei – 25 μm līdz 43 μm. Tomēr šiem mērījumiem nav nekādas nozīmes diagnostikā, jo trihinellu var viegli izolēt un identificēt tikai tās muskuļu kāpura stadijā (Pozio & La Rosa, 2010; Pozio & Zarlenga, 2019). Zarnu izliekums parasti ir tuvu izliekuma virsmai; dažos kāpuros tā

var būt tuvu ieliekuma virsmai; zarnas šķērso gonādas no izliekuma uz ieliekuma virsmu, dažos kāpuros var novērot, ka zarna šķērso gonādu no ieliekuma uz izliekuma virsmu un tad atkal šķērso gonādu uz izliekuma virsmu. Nevienā no pētījumu rezultātiem (**II, IV**) netika novērots, ka zarnas šķērsotu gonādu divas reizes ne tēviņu, ne mātītes paraugos. Vēl viena pazīme ar ko var atšķirt trihinellas kāpuru dzimums ir pēc gala zarnas garuma. Tēviņiem vidējais gala zarnas garums ir 40 μm līdz 50 μm , bet mātītēm tas ir gandrīz uz pusi mazāks 17 μm līdz 35 μm . Pētījuma laikā tika izstrādāts krāsošanas protokols (**II**), kas ir piemērots kāpura dzimuma noteikšanai, izmērot gala zarnas garumu trihinella kāpuriem. Pētījuma rezultātos tika iegūts, ka gala zarnas garums *T. britovi* tēviņiem ir $41.08 \pm 4.26 \mu\text{m SD}$ un *T. spiralis* - $46.08 \pm 2.95 \mu\text{m SD}$; mātītēm $21.19 \pm 2.45 \mu\text{m SD}$ un $20.55 \pm 1.48 \mu\text{m SD}$. Iegūtie pētījuma dati sakrīt ar citu pētījumu datiem un apstiprina, ka tēviņu gala zarnas garums ir divreiz lielāks nekā mātītēm (Kozek 1975; Liu et al., 1991, Pozio & La Rosa, 2010). Trihinellu kāpuru dzimuma noteikšana ir būtiska, nosakot parazitā dzimumu attiecību saimniekorganismā. Attīstot jaunas metodes parazitā dzimuma noteikšanā, iegūtie dati būtu noderīgi parazitā populācijas reproduktīvās stratēģijas kontrolēšanā (Pires-da Silva, 2007). Jebkurā gadījumā dzimuma attiecība ir svarīga populācijas pētījumos. Parasti, parazitā populācijas ir fragmentētas vietā un laikā un *Trichinella* ģintij ir raksturīga māsu un brāļu kopīga transmisija.

Pētījumā iegūtie rezultāti apstiprināja tipisko nematodes ķermeni (**II, IV**): šaurāka ķermeņa priekšējā daļa un platāka ķermeņa aizmugurējā daļa. Tika iezīmētas ķermeņa iekšējās struktūras, tajā skaitā ķermeņa siena (kutikula, hipoderma un hipodermālie muskuļi) (**II**). Kāpuru kutikula sastāv no trīs vai vairāk ārējiem slāņiem, kas ir veidoti no kolagēna un citām sastāvdaļām. Epiderma vai hipoderma veido ārējo kutikulas slāni un šis slānis ir bezšūnu (Lichtenfels et al., 1983). Iegūtie rezultāti uzrādīja augstu fluorescences signālu kāpuru kutikulā (**II, IV**). Augstā fluorescences signāla cēlonis kutikulā var būt lipīdu uzkrāšanās trihinellas kāpuru epikutikulā, attiecīgi lipīdi ir enerģijas avots parazitā izdzīvošanai saimnieka muskuļu šūnās (Gounaris et al., 1996). Kopumā trihinellas ķermeni klāj rievota kutikula (Hetherington, 1924) un šī pētījuma laikā tika novērots, ka pastāv atšķirības starp *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru kutikulu. *T. spiralis* kāpuriem tika novērots rievojums, tā saucamā “pseudosegmentācija”, savukārt *T. britovi* kutikulā netika novērotas šķērsas līnijas vai rievojums (**II**). Lai gan muskuļu kāpurs vēl ir vienā no savām attīstības stadijām, tam jau ir pietiekami attīstīti orgāni (McVay et al., 1998). Pētījumos apstiprinājās, ka muskuļu kāpuram ir attīstīta gan gremošanas, gan reproduktīvā orgānu sistēma (**II, IV**). *Stichosome* ir eksokrīnais orgāns,

kas aizņem aizmugurējo kāpura ķermeņa daļu un ir cieši saistīts ar barības vadu. *Stichosome* veido viena rinda 45-55 stihocītu ar citoplazmatiskajām granulām, kuras tiek izdalītas ārpus barības vada (Despommier & Müller, 1976). *Stichosome* un stihocīti tika novēroti gan saldētos paraugos, krāsoti ar P8 (**IV**), gan svaigi izdalītos paraugos, krāsoti ar AZM (**II**). Krāsojot paraugus ar AZM (**II**), tika novērots arī barības vads, kas sastāv no vienslāņa epitēlija ar bazālo membrānu bazālajā pusē. Citi pētījumi ir apstiprinājuši, ka trihinellu barības vadā ir novērojami četri epitēliju tipi un dažas no epitēlija šūnām ir mioepitēlijs, kas nodrošina barības vada peristaltiku (Tahahashi, 2021). Pētījumos (**II**, **IV**) netika novērotas dažādas epitēliju šūnas, bet pastāv iespēja, ka, optimizējot krāsošanas protokolu, tās varētu novērot, izmantojot KLSM. Ķermeņa aizmugurējo daļu aizņem viduszarna un dzimumorgānu aizmetnis, tie abi novietoti paralēli viens otram. Visticamākais, ka viduszarnas funkcija ir barības vielu absorbcija (Takahashi et al., 1988). Ar AZM krāsotajos paraugos tika novērota gan viduszarna, gan dzimumorgānu aizmetnis (**II**), bet ar P8 – tikai dzimumorgānu aizmetnis (**IV**). Ar AZM tika iekrāsotas visa gremošanas orgānu sistēma (**II**). Vēl viena pazīme, kas var atšķirt tēviņu no mātītes kāpura, ir glikogēna krājumu daudzums dzimumorgānu aizmetnī (Takahashi et al., 1987). Mātītēm šie krājumi ir lielāki, līdz ar to, krāsojot paraugus ar benzantrona luminoforiem, vietā, kur būs lielāks glikogēna daudzums, būs novērojama intensīvāka fluorescence. Rezultātu izvērtēšanā tika secināts, ka glikogēna krājumus mātītes kāpuros labāk iekrāso P8 (**IV**).

Pētījumā ar AZM luminoforu tika novērots nervu gredzens, bet netika novērotas detalizētākas struktūras. Ar P8 luminoforu (**IV**) netika vizualizētas nervu sistēmas daļas.

Izstrādātais krāsošanas protokols (**II**) tika izmēģināts ar komerciālo luminoforu, attiecīgi, tika veiktas visas tās pašas darbības, tikai sintezētā benzantrona luminofora vietā tika izmantots 3-metokibenzantrons. Tika izmantoti tie paši lāzeri ar tiem pašiem viļņu garumiem un filtriem. Iegūtie rezultāti apstiprināja, ka katram sintezētajam luminoforam un bioloģiskam paraugam ir jāizveido specifisks krāsošanas protokols.

Lai gan iegūtie rezultāti (**II**, **IV**) apstiprināja citu pētnieku gūtās atziņas un tika novērotas divas būtiskākās pazīmes, kas atšķir tēviņu kāpurus no mātītēm, tomēr ir vajadzīgi papildus pētījumi par citām Nematoda tipa sugām. Pavisam droši varam teikt, ka tālākā nākotnē izstrādātie protokoli tiks optimizēti, iespējams, tik tālu, lai iekrāsoju jau konkrētas orgānu sistēmas vai to struktūras.

Kopumā tika sintezēti deviņi benzantrona luminofori *P. fasciolaemorpha* (ad.) (AM323, AZPP), *D. spathaceum* (mtc.), *D. subclaviatus* (ad.) un *P. confusus* (ad.) (AM1,

AM2, AM4, AM16, P8), *T. spiralis* un *T. britovi* (AZM, P13) efektīvai un ātrai izpētei. Apkopojot iegūtos rezultātus, jāsecina, ka benzantroni ar aminoamido funkcionālo grupu sniedza viskvalitatīvākos rezultātus gan Trematoda klases, gan Nematoda tipa parazītu sugu izpētē. Tika izstrādāti noteikti krāsošanas protokoli parazītu sugu efektīvai un ātrai izpētei, izmantojot KLSM, iegūstot detalizētus rezultātus divu stundu laikā. Protokolu izstrādes laikā tika novērots, ka krāsošanas soļa ilgumu trematodes paraugiem nosaka tas, no kāda saimnieka (poikiloterma vai homoterma) trematode tikusi iegūta. Krāsošanas protokoli var tikt izmantoti paraugiem, kas fiksēti septiņos dažādos ķīmiskos fiksatoros, kā arī trīs dažādu tipu trihinellu kāpuru parazītiem: vienas dienas laikā no dzīvnieku muskulatūras izdalītiem un fiksētiem kāpuriem; kāpuriem, kas uzglabāti 96% etanolā un sasaldētiem kāpuriem dzīvnieku muskulatūrā. Izmantojot specifisku benzantrona luminoforus un noteiktus krāsošanas protokolus, ir iespējams noteikt atšķirības *T. spiralis* un *T. britovi* kutikulas uzbūvē un precīzi noteikt abu trihinellu kāpuru dzimumu.

SECINĀJUMI

1. Kopumā tika aprobēti deviņi sintezētie benzantrona luminofori Trematoda klases un Nematoda tipa parazītu sugu efektīvai un ātrai izpētei (**I, II, III, IV**).
2. *P. fasciolaemorpha* (ad.) (**I**), *D. spathaceum* (mtc.), *D. subclaviatus* (ad.), *P. confusus* (ad.) (**III**) parazītu, kas fiksēti 70% un 96% etanolā; AFA, Karnoja un Bouina šķīdumā; 10% neitrāli buferētā formalīnā sugu efektīvai un ātrai izpētei tika izstrādāti krāsošanas protokoli, izmantojot AM323, AZPP, AM1, AM2, AM4, AM16 un P8 benzantrona luminoforus. *P. fasciolaemorpha* parazītu paraugu anatomiskās un muskulatūras izkārtējuma detalizētai izpētei ar AZPP luminoforu vispiemērotākie ir 70% etanolā vai AFA šķīdumā fiksēti paraugi: 70% etanols un AZPP luminofors ārējo struktūru un muskuļu slāņu izpētei; AFA šķīdums un AZPP luminofors iekšējo struktūru izpētei. Bouina fiksators nav piemērots *P. fasciolaemorpha* paraugu fiksēšanai, ja tie tiek analizēti ar KLSM (**I**). AM1, AM2, AM4, AM16 un P8 luminofori dod iespēju detalizēti vizualizēt gremošanas un reproduktīvo sistēmu *D. spathaceum* (mtc.), fiksētiem 96% etanolā; *D. subclaviatus* (ad.), fiksētiem Karnoja šķīdumā; *P. confusus* (ad.) fiksētiem AFA šķīdumā (**III**). Tika secināts, ka no poikiloterma saimnieka izolētas trematodes krāsošanai ir vajadzīgs mazāk laika nekā no homoterma saimnieka izolētas trematodes krāsošanai.
3. *T. spiralis* un *T. britovi* parazītu, kas fiksēti 70% un 96,6% etanolā; AFA, Karnoja un Bouina šķīdumā sugu efektīvai un ātrai izpētei tika izstrādāti krāsošanas protokoli, izmantojot AZM un P13 benzantrona luminoforus. Tika secināts, ka sintezētais benzantrona luminofors AZM ir piemērots no dzīvnieku muskulatūras izolētiem trihinellas kāpuriem, fiksētiem dažādos ķīmiskos fiksatoros, izpētei. Izstrādātais krāsošanas protokols ir piemērots *T. spiralis* un *T. britovi* kāpuru dzimumu noteikšanai, mērot kāpuru gala zarnas garumu (**I**). Sasaldētā dzīvnieku muskulatūrā vai 96,6% etanolā uzglabātu *T. britovi* kāpuru efektīvai un ātrai izpētei tika izstrādāts krāsošanas protokols ar P13 (**IV**).
4. Trematoda klases un Nematoda tipa parazītu sugu efektīvai un ātrai izpētei izstrādāti noteikti krāsošanas protokoli, izmantojot specifiskus benzantrona luminoforus. Atrasti piemērotākie ķīmiskā fiksatora un benzantrona luminofora kompleksi paraugu izpētei, pielietojot KLSM: *P. fasciolaemorpha* (ad.) 70% etanols vai AFA šķīdums un AZPP (**I**); *T. spiralis* un *T. britovi* Bouina šķīdums un AZM (**II**); *D. spathaceum* (mtc.) 96% etanols, *D. subclaviatus* (ad.) Karnoja šķīdums, *P. confusus* (ad.) AFA

šķīdums un AM1, AM2, AM4, AM16 un P8 (**III**); *T. britovi* 96,6% etanolā līdz trīs gadiem vai saldēti kāpuri dzīvnieku muskulatūrā līdz diviem gadiem un P13 (**IV**).

PATEICĪBAS

Vēlos pateikties promocijas darba zinātniskajiem vadītājiem Dr. biol, vad. pētn. Muzai Kirjušīnai un Dr. biol. Inesei Gavarānei par ieguldīto laiku, par aktīvu sadarbību, par vienmēr vērtīgajiem padomiem un komentāru sniegšanu diskusijās, par palīdzību kvalitatīvu zinātnisko rakstu sagatavošanā, par motivāciju, par sapratni un atbalstu.

Paldies DU DZTI Lietišķās ķīmijas departamentam par sintezētajiem benzantrona luminofooriem Trematoda klases un Nematoda tipa efektīvai un ātrai izpētei.

Liels paldies visiem rakstu līdzautoriem: Gavarane I., Kirilova E., Mezaraupe L., Kirjusina M., Osipovs S., Deksnē G., Pučkīns A., Kokina I., Bulanovs A. Kecko S., Plaksenkova I., Pupiņš M. Paldies visiem, kas atbalstīja un bija iesaistīti promocijas darba tapšanā, paraugu vākšanā un izolēšanā. Īpašs paldies Ligitai Mežaraupei par atbalstu pētījuma praktiskās daļas veikšanā.

Paldies manai ģimenei par izturību, atbalstu un motivāciju. Promocijas darbs ir izstrādāts, izmantojot Eiropas Reģionālā attīstības fonda līdzfinansētā projekta „Jaunu luminescentu savienojumu molekulārais dizains diagnostikas mērķiem”, vienošanās Nr. 1.1.1.1/16/A/211 ietvaros.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Acevedo-Whitehouse K & Duffus ALJ (2009) Effects of environmental change on wildlife health. *Proc R Soc Lond B* 364:3429–3438
2. Alfano RR, Tata DB, Corsero J, Tomashefsky P, Longo FW, Alfano MA (1984) Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. *IEEE J Quantum Elect* 20:1507–1511
3. Allan L, Mbai FN, Yole DS, Owino M (2020) Intensity of nematode infection in children aged 3 to 5 Years living in mukuru kwa Njenga slum settlement, Nairobi, Kenya. *J. Trop. Med.* Article ID 4124808: 1-7
4. Ancelle T, Dupouy-Camet J, Bougnoux ME, Fourestie V, Petit H, Mougeot G, Nozais JP, Lapiere J (1988) Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985. *Am. J. Epidemiol.* 127:1302–1311
5. Andrade-Becerra JI, Pompa-Mera EN, Ribas-Aparicio RM, Yépez-Mulia L (2017) Vaccination against *Trichinella spiralis*: Potential, Limitations and Future Directions, 219-238
6. Anonymous (1964) Summary of the discussion. In: Corradetti, A., Ed., Proceedings of the 1st International Congress of Parasitology, Rome, September 21–26. Tamburini Editore, Milan, p. 697
7. Arneberg P (2002) Host population density and body mass as determinants of species richness in parasites communities: comparative analyses of directly transmitted nematodes of mammals. *Ecography* 25:88–94
8. Ax P (1985) The position of the Gnathostomulida and Platyhelminthes in the phylogenetic system of the Bilateria. In: Conway Morris S, George JD, Gibson R, Platt Hhf, eds. The origins and relationships of lower invertebrates. Oxford: Clarendon Press, 168- 180
9. Bacallao R & Stelzer EHK (1989) Preservations of biological specimens for observation in a confocal fluorescence microscopy, operational principles of confocal fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.* 31:437–452
10. Bacallao R, Sohrab S, Phillips C (2006) Guiding Principles of Specimen Preservation for Confocal Fluorescence Microscopy, 10.1007/978-0-387-45524-2_18
11. Baglaev TN, Kalinin NN, Dobretsov GE, Kosankova ST, Vladimirov YA (1982) Differences in leukocyte membranes detectable by a fluorescent probe in chronic leukemias. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 93:35-37

12. Bai X, Wu X, Wang X, Guan Z, Gao F, Yu J, Yu L, Tang B, Liu X, Song Y, Wang X, Radu B, Boireau P, Wang F & Liu M (2012) Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* *in vitro*. *Mol Cell Biochem* 360:79–88
13. Bai X, Wu X, Wang X, Liu X, Song Y, Gao F, Miao Y, Yu L, Tang B, Wang X, Radu B, Vallee I, Boireau P, Wang F, Zhao Y & Liu M (2011) Inhibition of mammalian muscle differentiation by excretory secretory products of muscle larvae of *Trichinella spiralis* *in vitro*. *Parasitol Res* 110:2481–2490
14. Baines L, Morgan ER, Ofthile M, Evans K (2015) Occurrence and seasonality of internal parasite infection in elephants, *Loxodonta africana*, in the Okavango Delta Botswana. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4:43–48
15. Baker JR (1958) *J. Histochem. Cytochem.*: Official J. Histochem. Soc. 6:303–308
16. Bamidele A (2007) Histopathological study on the parasitised visceral organs of some fishes of Lekki Lagon, Lagos, Nigeria. *Life Sci.* 4(3):70-76
17. Beckmann S & Grevelding CG (2010) Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 40(5):521-526
18. Behrmann-Godel J & Brinker A (2016) Biology and Ecology of Perch Parasites. In book: *Biology of Perch* Chapter, CRC Press 193-229
19. Belopolskaya MM (1963) Family Microphallidae Travassos, 1920. In: Skrjabin KI (ed) *Trematodes of animals and human*. Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moscow 21:259–502 (in Russian)
20. Bennett APS & Robinson MW (2021) Trematode Proteomics: Recent Advances and Future Directions. *Pathogens* 10:348
21. Bennett CE (1975) Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* L. during growth and maturation in the mouse. *J Parasitol* 61(5):892–898
22. Bergmane B, Bērziņa D, Visocka A (2019) Histopathological changes in liver of elks with *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* invasion. *Res. Rural. Dev.* 1:262–264
23. Bergmane B, Keidāne D, Krūklīte A, Berziņa D (2017) Invasion of *Parafasciolopsis* in elks in Latvia. In *Proceedings of the Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna. Konferenču “Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes” RAKSTI*, Jelgava, Latvia, 24 November 2017

24. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ (2006) Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet Infect Dis* 367:1521–1532
25. Bilska-Zajac E, Tonanzi D, Pozio E, Rozycki M, Cencek T, Thompson PC, Rosenthal BM, La Rosa G (2021) Genetic evidence substantiates transmission of *Trichinella spiralis* from one swine farm to another. *Parasit Vectors* 14(1):1-13
26. Blaxter M & Koutsovoulos G (2015) The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology* 142:S26–S39
27. Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392:71–75
28. Bolanos DM & Litvaitis MK (2009) Embryonic muscle development in direct and indirect developing marine flatworms (Platyhelminthes, Polycladida). *Evol Dev.* 11:290–301
29. Bordes F, Blumstein DT, Morand S (2007) Rodent sociality and parasite diversity. *Biol Lett* 3:692–694
30. Bordes F, Morand S, Guerrero R (2008) Bat fly species richness in neotropical bats: correlations with host ecology and host brain. *Oecologia* 158:109–116
31. Bordes F, Morand S, Kelt DA, Van Vuren DH (2009) Home range and parasite diversity in mammals. *Am Nat* 173:467–474
32. Bordes F, Morand S, Krasnov BR, Poulin R (2010) Parasite diversity and latitudinal gradients in terrestrial mammals. In: Morand S, Krasnov BR (eds) *The biogeography of host-parasite interactions*. Oxford University Press, UK, pp 89–98
33. Borges N, Costa VS, Mantovani C, Barros E, Santos EGN, Marfa CL, Santos CP (2017) Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*. *J Fish Dis* 40:191–203
34. Briede I & Kirjušina M (2018) Zivis un vēži Latvijas akvakultūrā: bioloģija un slimības. [Monogrāfija]. Zivju fonds un Daugavpils Universitāte, p. 399
35. Brown CM (2007) Fluorescence microscopy – avoiding the pitfalls. *J. Cell Sci.* 120:1703–1705
36. Bruschi F & Pozio E (2019) Trends in Parasitology | Parasite of the Month *Trichinella*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.003>

37. Budke CM, White AC Jr, Garcia HH (2009) Zoonotic larval cestode infections: neglected, neglected tropical diseases? PLOS Negl. Trop. Dis. 3:e319
38. Bulantova J, Chanova M, Houzviczkova L, Hora'k P (2011) *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae): changes of body wall musculature during the development from miracidium to adult worm. Micron 42:47–54
39. Carlini F, Paffoni C, Boffa G (1982) New daylight fluorescent pigments. Dyes Pigm 3:59–69
40. Castro GA (1996) Chapter 86 Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development Flukes (Trematodes), 1-6
41. Chai JY, Kim JL, Seo M (2014b) Four human cases of *Acanthotrema felis* (Digenea: Heterophyidae) infection in Korea. Korean J Parasitol 52:291–294
42. Chai JY, Sohn WM, Na BK, Yong TS, Eom KS, Yoon CH, Hoang EH, Jeoung HG, Socheat D (2014a) Zoonotic trematode metacercariae in fish from Phnom Penh and Pursat, Cambodia. Korean J Parasitol 52:35–40
43. Charlier J, Rinaldi L, Musella V, Ploeger HW, Chartier C, Rose Vineer H, Hinney B, von Samson-Himmelstjerna G, Băcescu B, Mickiewicz M, Mateus TL, Martinez-Valladares M, Quealy S, Azaizeh H, Sekovska B, Akkari H, Petkevicius S, Hektoen L, Höglund J, Morgan ER, Bartley DJ, Claerebout E (2020) Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. Prev. Vet. Med. 182:[105103]
44. Cheng F, Young AJ, Bouillard JSG, Kemp NT, Guillet-Nicolas R, Hall CH, Roberts D, Jaafar AH, Adawi AM, Kleitz F, Imhof A (2019) Dynamic electric field alignment of metal–organic framework microrods. J. Am. Chem. Soc. 141(33):12989-12993
45. Chikhlyayev IV, Kirillov AA, Kirillova NY (2012a) Trematodes (Trematoda) of amphibians (Amphibia) of the Middle Volga region. 1. Orders Fasciolida, Hemiurida, Paramphistomida and Strigeida. Parazitologiya 46(3):171-192
46. Chikhlyayev IV, Kirillov AA, Kirillova NY (2012b) Trematodes (Trematoda) of amphibians (Amphibia) of the Middle Volga region. 2. Order Plagiorchiida. Parazitologiya 46(3):290-313
47. Chikhlyayev IV, Kirillova NY, Kirillov AA (2018) Ecological analysis of trematodes (Trematoda) of march frog *Pelophylax ridibundus* (Ranidae, Anura) from various habitats of the national park “Samarskaya luka” (Russia). J. Nat. Conserv. 3 (Suppl. 1):36–50

48. Chubb JC (1962) Acetic acid as a diluent and dehydrant in the preparation of whole, stained helminths. *Biotech Histochem* 37:179–182
49. Chung KT & Stevens SE Jr (1993) Degradation azo dyes by environmental microorganisms and helminths., 12(11):2121–2132
50. Codina AV, Priotti J, Leonardi D, Vasconi MD, Lamas MC, Hinrichsen LI (2021) Effect of sex and genotype of the host on the anthelmintic efficacy of albendazole microcrystals, in the CBI-IGE *Trichinella* infection murine model. *Parasitology* 148(13):1545-1553
51. Cohen C, Reinhardt B, Castellani L, Norton P, Stirewalt M (1982) Schistosome surface spines are Bcrystals of actin. *J Cell Biol* 95(3):987–988
52. Collins JJ III, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA (2011) An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Negl Trop Dis* 5(3):e1009
53. Corrales JL, Cwiklinski K, De Marco Verissimo C, Dorey A, Lalor R, Jewhurst H, McEvoy A, Diskin M, Duffy C, Cosby SL, Keane OM, Dalton JP (2021) Diagnosis of sheep fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* using cathepsin L enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Vet Parasitol.* 298:109517
54. Crawley JAH, Chapman SN, Lummaa V, Lynsdale CL (2016) Testing storage methods of faecal samples for subsequent measurement of helminth egg numbers in the domestic horse. *Vet. Parasitol.* 221:130-133
55. Cribb TH & Bray RA (2010) Gut wash, body soak, blender, and heatfixation: approaches to the effective collection, fixation and preservation of trematodes of fishes. *Syst Parasitol* 76:1–7
56. Daily GC & Ehrlich PR (1996) Global change and human susceptibility to disease. *Annu Rev Energ Environ* 21:125–144
57. Dapson RW (2007) The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. *Biotech. Histochem.* 82:173–187
58. Davies C (1979) The forebody glands and surface features of the metacercariae and adults of *Microphallus similis*. *Int J Parasitol* 9(6):553–564
59. Davila S, Manso PPA, Bessa ECA, Rodrigues MLA, Dias RJP (2010) Gross anatomy of the musculature and a new description of the reproductive system of *Tanaisia bragai* and *Tanaisia inopina* (Trematoda: Eucotylidae) analysed by confocal laser scanning microscopy. *Acta Zool-Stocholm* 91:139–149

60. De Wall T & Mehmood K (2021) Editorial: Trematode Infection in Ruminants. *Front. Vet. Sci.* 8:719577
61. Deksne G, Segliņa Z, Jahundoviča I, Esīte Z, Bakasejevs E, Bagrade G, Keidāne D, Interisano M, Marucci G, Tonanzi D, Pozio E, Kirjušina M (2016) High prevalence of *Trichinella* spp. in sylvatic carnivore mammals of Latvia. *Vet Parasitol* 231:118–123
62. Demchenko AP (2020) Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods Appl. Fluoresc.* 8:02200196
63. Despommier DD & Müller M (1976) The stichosome and its secretion granules in the mature muscle larva of *Trichinella spiralis*. *J Parasitol* 62(5):775-785
64. Dick TA & Pozio E (2001) *Trichinella* spp. and trichinellosis. In: Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A.A. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, pp. 380–396
65. Dick TA (1983) Species, and infraspecific variation. In: Campbell, W.C. (Ed.) *Trichinella* and Trichinosis. Plenum Press, New York and London, pp. 31–73
66. Dobretsov G, Dmitriev V, Pirogova L, Petrov V, Vladimirov Y, Dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone as fluorescent probes to study biomembranes. III Relationship between state of hydration shell of membrane and state of phospholipids. *Stud. Biophys.* 71:189–196
67. Dobretsov GE (1983) *Fluorescent probes in investigation of cells, membranes and lipoproteins*. Nauka, Moscow
68. Dobretsov GE (1989) *Fluorescent Probes in the Studies of Cells, Membranes and Lipoproteins*. Moscow, Russia: Nauka
69. Dobson A, Lafferty KD, Kuris AM, Hechinger RF, Jetz W (2008) Homage to Linnaeus: how many parasites? How many hosts? *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11482–11489
70. Durko L & Małecka-Panas E (2015) The role of confocal microscopy in the diagnosis of pancreatic neoplasms. *Postępy Nauk Medycznych* 28:38-41
71. Eggeling C, Widengren J, Rigler R (1999) C. A. M. Seidel in *Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine* (Eds.: W. Rettig, B. Strehmel, M. Schrader, H. Seifert), Springer, Berlin, p. 193
72. Ehlers U (1985) *Das Phylogenetische System der Plathelminthes*. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, p. 317

73. Elliott AC (2020) Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom.* 92(1):e68
74. Fakhar M & Ghobaditara M (2016) Phenazopyridine as an innovative stain for permanent staining of trematodes. *Trop. Parasitol.* 6:86–88
75. FAO and WHO. 2020. Risk-based examples and approach for control of *Trichinella* spp. and *Taenia saginata* in meat, Revised edition. Microbiological Risk Assessment Series, Rome, No. 25
76. Farmilo AJ & Stead RH (2009) Fixation and processing. *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods*. 5th edition. Carpinteria, CA: Dako North America, 29-33
77. Feliu C, Renaud F, Catzeflis F, Hugot JP, Durand P, Morand S (1997) A comparative analysis of parasite species richness of Iberian rodents. *Parasitology* 115:453–466
78. Filip KJ & Demiaszkiewicz AW (2016) Internal parasitic fauna of elk (*Alces alces*) in Poland. *Acta Parasitol.* 61:657–664
79. Filip KJ, Pyziel AM, Demiaszkiewicz AW (2016) A massive invasion of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* in elk (*Alces alces*) in Lublin Province, Poland. *Ann. Parasitol.* 62:107–110
80. Filip-Hutsch K, Czopowicz M, Barc A, Demiaszkiewicz AW (2021) Gastrointestinal Helminths of a European Moose Population in Poland. *Pathogens* 10:456
81. Filip-Hutsch K, Czopowicz M, Świsłocka M, Ratkiewicz M, Borkowska A, Kowalczyk R, Demiaszkiewicz AW (2020) Patterns of parasite eggs, oocysts and larvae shedding by moose in the Biebrza marshland (NE Poland) *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 11:191–197
82. Filip-Hutsch K, Hutsch T, Kolasa S, Demiaszkiewicz AW (2019) First Description of Histopathological Lesions associated with a Fatal Infection of Moose (*Alces Alces*) with the Liver Fluke *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* Ejsmont, 1932. *J. Vet. Res.* 63:549-554
83. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985) Formaldehyde Fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33(8):845-853
84. Galaktionov KV & Dobrovolskij AA (2003) *Biology and Evolution of Trematodes. An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmission, and Evolution of Digenetic Trematodes.* London: Kluwer Academic Publishers; 17
85. Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K, Gajadhar AA, Van Knapen F, Noeckler K, Schenone H, Zhu X (2000) International Commission on Trichinellosis:

- recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.* 93(3-4):393-408
86. Gavarane I, Kirilova E, Rubeniņa I, Mežaraupe L, Osipovs S, Deksne G, Pučkīns A, Kokina I, Bulanovs A, Kirjušina M (2019) A Simple and Rapid Staining Technique for Sex Determination of *Trichinella* Larvae Parasites by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microsc. Microanal.* 1–7
 87. Gavarane I, Mežaraupe L, Rubenina I, Kirjusina M, Kirilova J (2018) Staining of economically important parasitic nematodes by developed derivatives of benzantrone luminophore. 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018, section Advances in Biotechnology 581–587
 88. Geller ER & Timonov EV (1969a) Study of the morphogenesis of *Trichinella spiralis* in a fluorescent microscope. *Wiadomosci Parazytologiczne* 15(5/6):522-525
 89. Geller ER & Timonov EV (1969b) A study of muscle trichinae by secondary fluorescence. *Trudy vsesoyuznogo Instituta Gelmintologii* 15:79-86
 90. Gillespie SH, Hawkey PM (1995) *Medical Parasitology: A Practical Approach.* Oxford, UK: IRL Press
 91. Ginetsinskaya T (1988) *Trematodes, Their Life Cycles, Biology and Evolution.* New Delhi: Amerind Publ. Co. Pvt. Ltd.
 92. Gołos B, Dąbrowska M, Wałajtys-Rode E, Zieliński Z, Wińska P, Cieśla J, Jagielska E, Moczoń T, Rode W (2012) Immunofluorescent localization of thymidylate synthase in the development of *Trichinella spiralis* and *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol* 183(1):63-69
 93. Gonta S, Utinans M, Kirilov G, Belyakov S, Ivanova I, Fleisher M, Savenkov V, Kirilova E (2013) Fluorescent substituted amidines of benzantrone: synthesis, spectroscopy and quantum chemical calculations. *Spectrochim Acta A* 101:325–334
 94. González-Miguel J, Valero MA, Reguera-Gomez M, Mas-Bargues C, Bargues MD, Simón F, Mas-Coma S (2019) Numerous *Fasciola plasminogen*-binding proteins may underlie blood-brain barrier leakage and explain neurological disorder complexity and heterogeneity in the acute and chronic phases of human fascioliasis. *Parasitology* 146:284–298
 95. Gorbenko G, Trusova V, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I, Vasilev A, Kaloyanova S, Deligeorgiev T (2010) New fluorescent probes for detection and characterization of amyloid fibrils. *Chem Phys Lett* 495:275–279

96. Gounaris K, Smith VP, Selkirk ME (1996) Structural organisation and lipid composition of the epicuticular accessory layer of infective larvae of *Trichinella spiralis*. *Biochim Biophys Acta* 1281:91–100
97. Gower AC (1939) A modified stain and procedure for trematodes. *Stain Tech.* 14:31-2
98. Grabchev I & Moneva I (1998) Synthesis and properties of benzanthrone derivative as luminophore dyes for liquid crystals. *Dyes Pigm.* 37:155–65
99. Grabchev I, Bojinov V, Moneva I (2001) The synthesis and application of fluorescent dyes based on 3-amino benzanthrone. *Dyes Pigm.* 48:143–150
100. Grabda J (1991) *Marine fish parasitology an outline*. Warszawa, PWN-Polish Scientific Publishers, p. 306
101. Groma V & Zalcmane V (2012) Šūna: uzbūve, funkcijas, molekulārie pamati. – *Rīgas Stradiņa Universitāte* 13 – 15:262
102. Guida S, Arginelli F, Farnetani F, Ciardo S, Bertoni L, Manfredini M, Zerbinati N, Longo C, Pellacani G (2021) Clinical Applications of *In Vivo* and *Ex Vivo* Confocal Microscopy. *Appl. Sci.* 11:1979
103. Halton DW & Maule AG (2004) Flatworm nerve-muscle: Structural and functional analysis. *Can. J. Zool.* 82:316–333
104. Halton DW (1997) Nutritional adaptations to parasitism within the Platyhelminthes. *Int. J. Parasitol.* 27:693–704
105. Halton DW (2004) Microscopy and the helminth parasite. *Micron* 35:361–390
106. Han D, Goudeau B, Manojlovic D, Jiang D, Fang D, Sojic N (2021) Electrochemiluminescence Loss in Photobleaching. *Angew. Chem. Int. Ed.* 60:7686–7690
107. Hao Y, Zhao X, Yang J, Gu Y, Sun R, Zhu X (2014) Monoclonal antibody targeting complement C9 binding domain of *Trichinella spiralis* paramyosin impairs the viability of *Trichinella* infective larvae in the presence of complement. *Parasite Vector* 7:313–320
108. Hao YN, Zheng AQ, Guo TT, Shu Y, Wang JH, Johnson O, Chen W (2019) Glutathione triggered degradation of polydopamine to facilitate controlled drug release for synergic combinational cancer treatment. *J Mater Chem B* 7(43):6742-6750
109. Hegazy R & Hegazy A (2015) Hegazy' Simplified Method of Tissue Processing (Consuming Time and Chemicals). *AIMDR* 1(2):57-61

110. Held P (2015) Sample Preparation for Fluorescence Microscopy: An Introduction. White Paper: www.agilent.com/lifesciences/biotek
111. Hernandez-Bello R, Bermudez-Cruz RM, Fonseca-Linan R, Garcia-Reyna P, Le Guerhier F, Boireau P, Ortega-Pierres G (2008) Identification, molecular characterisation and differential expression of caveolin-1 in *Trichinella spiralis* maturing oocytes and embryos. *Int. J. Parasitol.* 38:191–202
112. Hetherington DC (1924) Comparative studies on certain features of nematodes and their significance. *Illinois biological monographs* 8(2):1-62
113. Howat WJ & Wilson BA (2014) Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70:12–19
114. Hu CH, Xu YXY, Hao HN, Liu RD, Jiang P, Long SR, Wang ZY, Cui Y (2021) Oral vaccination with recombinant *Lactobacillus plantarum* encoding *Trichinella spiralis* inorganic pyrophosphatase elicited a protective immunity in BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis* 15(10):e0009865
115. Ilie MA, Caruntu C, Lupu M, Lixandru D, Tampa M, Georgescu SR, Bastian A, Constantina C, Neagu M, Zurac SA, Boda D (2019) Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology (Review) *Oncol. Lett.* 17:4102-4111
116. Janssen CS (1998) Biology of developmental activation of infective *Trichinella spiralis*. University of Glasgow (United Kingdom)
117. Jongwutiwes S, Chantachum N, Kraivichian P, Siriyasatien P, Putaporntip C, Tamburrini A, La Rosa G, Sreesunpasirikul C, Yingyoud P, Pozio E (1998) First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. *Clin. Infect. Dis.* 26:111–115
118. Jurberg AD, Pascarelli BM, Pelajo-Machado M, Maldonado A Jr, Mota EM, Lenzi HL (2008) Trematode embryology: a new method for whole-egg analysis by confocal microscopy. *Dev Genes Evol* 218:267–271
119. Justine JL (2007) *Huffmanella* spp. (Nematoda, Trichosomoididae) parasites in coral reef fishes off New Caledonia, with descriptions of *H. balista* n. sp. and *H. longa* n. sp. *Zootaxa* 1628:23–41
120. Justine JL, Beveridge I, Boxshall GA, Bray RA, Moravec F, Trilles JP, Whittington ID (2010) An annotated list of parasites (Isopoda, Copepoda, Monogenea, Digenea, Cestoda and Nematoda) collected in groupers (Serranidae,

- Epinephelinae) in New Caledonia emphasizes parasite biodiversity in coral reef fish. *Folia Parasitol* 57:237–262
121. Justine JL, Briand MJ, Bray RA (2012) A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. *Parasitol Res* 111:341– 351
 122. Kalnina I, Klimkane L, Kirilova E, Toma MM, Kizane G, Meirovics I (2007) Fluorescent probe ABM for screening gastrointestinal patient's immune state. *J. Fluoresc.* 17:619–625
 123. Kanai Y, Inoue T, Mano T, Nonaka N, Katakura K, Oku Y (2007) Epizootiological survey of *Trichinella* spp. infection in carnivores, rodents and insectivores in Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* 54:175–182
 124. Kapel CM & Gamble HR (2000) Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int. J. Parasitol.* 30:215–221
 125. Kapel CM (2000) Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet. Parasitol.* 93:263–278
 126. Kapel CM (2001) Sylvatic and domestic *Trichinella* spp. in wild boars; infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. *J. Parasitol.* 87:309–314
 127. Kapusta P, Machalický O, Hrdina R, Nepraš M, Zimmt M.B, Fidler V (2003) Photophysics of 3-substituted benzantrones: Substituent and solvent control of intersystem crossing. *J. Phys. Chem. A* 107:9740–9746
 128. Karin K, Blaxter M, Fitch DHA (2021) Phylum Nematoda. *Invertebrate Zoology: A Tree of Life Approach*, 477-494
 129. Keidāne D, Krūklīte A, Ganola K (2017) Tārpu ierosināta slimība aļņiem – parafascioloze. <https://www.la.lv/tarpu-ierosinata-slimiba-alnkiem-parafascioloze>
 130. Khrolova OR, Kunavin NI, Komlev IV, Tavrizova MA (1984) Spectral and luminescence properties of phosphorylmethyl derivatives of 3-aminobenzathrone. *J Appl Spectr* 41:771–775
 131. Kirilova E, Ivanova I (2011) Novel benzanthrone dyes: synthesis and comparison of luminescent properties. *Materials Sciences and Applied Chemistry* 23:29-33
 132. Kirilova E, Mickevica I, Mezaraupe L, Puckins A, Rubenina I., Osipovs, S, Kokina I, Bulanovs A, Kirjusina M, Gavarane I (2019) Novel dye for detection of

- callus embryo by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Luminescence* 34:353–359
133. Kirilova EM, Belyakov SV, Kalnina I (2009) Synthesis and study of N,N-substituted 3-amidinobenzanthrones. In *Topics in Chemistry & Materials Science*. Vayssilov G, Nikolova R eds, Heron Press, pp. 19–28
134. Kirilova EM, Kalnina I, Kirilov GK, Meirovics I (2008) Spectroscopic study of benzanthrone 3-N-derivatives as new hydrophobic fluorescent probes for biomolecules. *J Fluoresc* 18:645–648
135. Kirilova EM, Meirovics I, Belyakov SV (2002) Preparation and properties of nitrogen derivatives of benzanthrone with heterocyclic fragments. *Chem Heterocycl Compd* 38(7):789-792
136. Kirilova EM, Nikolaeva ID, Romanovska E, Puckins AI, Belyakov SV (2020) The synthesis of novel heterocyclic 3-acetamide derivatives of benzanthrone. *Chem Heterocycl Comp* 56:192–198
137. Kirilova EM, Puckins AI, Romanovska E, Fleisher M, Belyakov SV (2018) Novel Amidine Derivatives of Benzanthrone: Effect of Bromine Atom on the Spectral Parameters. *Spectrochim. Acta A Mol. Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 202:41-49
138. Kirjušina M, Dekšne G, Marucci G, Bakasejevs E, Jahundoviča I, Daukšte A, Zdankovska A, Bērziņa Z, Esīte Z, Bella A, Galati F, Krūmiņa A, Pozio E (2015) A 38-year study on *Trichinella* spp. in wild boar (*Sus scrofa*) of Latvia shows a stable incidence with an increased parasite biomass in the last decade. *Parasite Vector* 8:1–8
139. Kirjusina M, Gavarane I, Mezaraupe L, Kecko S, Kirilova E (2018) Application of novel synthesized luminophore AZP5 for efficient staining of Trematoda: Fasciolidae parasites. *Int. Multidiscip. Sci. GeoConference SGEM*, 18:27–34
140. Køie M (1977) Stereoscan studies of cercariae, metacercariae, and adults of *Cryptocotyle lingua* (Creplin 1825) Fiscoeder 1903 (Trematoda: Heterophyidae). *J Parasitol* 63(5):835–839
141. Kołodziej-Sobocinska M, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Kowalczyk R (2018) Increased parasitic load in captive-released European bison (*Bison bonasus*) has important implications for reintroduction programs. *EcoHealth* 15 (2):467–471

142. Konstantinova T, Konstantinov H, Kaneva T (1998) On the synthesis and properties of copolymers of some benzanthrone dye derivatives with methacrylate, A. Spirieva, Polym. Degrad. Stab. 62:323
143. Koohsar F, Naddaf SR, Rokni MB, Mirjalali H, Mohebbali M, Shafiei R, Mowlavi G (2021) Serological Detection of Trichinellosis among Suspected Wild Boar Meat Consumers in North and Northeast of Iran. Iran J Parasitol. 16(2):253-260
144. Korkina LG, Dobretsov GE, Valtsel G, Kogan EM, Vladimirov YA (1978) Identification of Tand B-lymphocytes using a 3-methoxybenzanthrone fluorescent probe. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 238:999-1002
145. Kozek WJ (1975) *Trichinella spiralis*: Morphological characteristics of male and female intestine-infecting larvae. Exp Parasitol 37:380–387
146. Kremnev G, Gonchar A, Krapivin V, Knyazeva O, Krupenko D (2020) First elucidation of the life cycle in the family Brachycladiidae (Digenea), parasites of marine mammals. Int. J. Parasitol. 50(12):997-1009
147. Kremnev G, Gonchar A, Krapivin V, Uryadova A, Miroljubov A, Krupenko D (2021) Life cycle truncation in Digenea, a case study of *Neophasis* spp. (Acanthocolpidae). Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 15:158-172
148. Kritsky D & Bakenhaster M (2011) Monogenoidean parasites of the gill lamellae of the sheepshead *Archosargus probatocephalus* (Walbaum) (Perciformes: Sparidae) from the Indian River Lagoon, Florida, with descriptions of four new species of *Euryhaliotrema* Kritsky & Boeger, 2002 (Dactylogyridae). Syst Parasitol 78(1):57–68
149. Krivokapich SJ, Prous CL, Gatti GM, Confalonieri V, Molina V, Matarasso H, Guarnera E (2008) Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. Vet. Parasitol. 156:234–240
150. Krmpot AJ, Nikolić SN, Oasa S, Papadopoulos DK, Vitali M, Oura M, Mikuni S, Thyberg P, Tisa S, Kinjo M, Nilsson L (2019) Functional fluorescence microscopy imaging: quantitative scanning-free confocal fluorescence microscopy for the characterization of fast dynamic processes in live cells. Analytical chemistry 91(17):11129-11137
151. Krohne I, Pfeifer T, Bitte F, Zacher M, Meier R (2003) New method for confocal microscopy and its endoscopic application. In European Conference on Biomedical Optics, Optical Society of America 5143-5281

152. Krupenko D & Dobrovolskij AA (2018) Morphological framework for attachment and locomotion in several Digenea of the families Microphallidae and Heterophyidae. *Parasitol. Res.* 117:3799–3807
153. Krupenko D & Gonchar A (2017a) Ventral concavity and musculature arrangement in notocotylid maritae (Digenea: Notocotylidae). *Parasitol Int* 66(5):660–665
154. Krupenko D & Gonchar A (2017b) Musculature arrangement and locomotion in notocotylid cercariae (Digenea: Notocotylidae) from mud snail *Ecrobia ventrosa* (Montagu, 1803). *Parasitol. Int.* 66(3):262-271
155. Krupenko DY & Dobrovolskij AA (2015) Somatic musculature in trematode hermaphroditic generation. *BMC Evol. Biol.* 15:189
156. Krupenko DY (2014) Muscle system of *Diplodiscus subclaviatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous, and ovigerous adults. *Parasitol. Res.* 113:941–952
157. Krupenko DY (2019) Oral sucker in Digenea: Structure and muscular arrangement. *Zoomorphology* 138:29–37
158. Krupenko DY, Krapivin VA, Gonchar AG (2016) Muscle system in rediae and daughter sporocysts of several digeneans. *Zoomorphology* 135:405–418
159. Kumar D, Mcgeown JG, Reynoso-Ducoing O, Ambrosio JR, Fairweather I (2003) Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 127:457–473
160. Kuzmin SL (2012) Amphibians of the former USSR (2nd edit.). Association of Scientific Publications KMK, Moscow
161. La Grange LJ, Marucci G, Pozio E (2009) *Trichinella zimbabwensis* in wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) of South Africa. *Vet. Parasitol.* 161:88–91
162. La Rosa G, Marucci G, Zarlenga DS, Casulli A, Zarnke RL, Pozio E (2003a) Molecular identification of natural hybrids between *Trichinella nativa* and *Trichinella* T6 provides evidence of gene flow and ongoing genetic divergence. *Int. J. Parasitol.* 33:209–216
163. La Rosa G, Marucci G, Zarlenga DS, Pozio E (2001) *Trichinella pseudospiralis* populations of the Palearctic region and their relationship with populations of the Nearctic and Australian regions. *Int. J. Parasitol.* 31:297–305

164. Lachowicz J (1987) Experimental infection with *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* in sheep. Polska Akademia Nauk, Warszawa (Poland). Inst. Parazytol. 43:461–465
165. Laxmareddy B & Benarjee G (2013) Intestinal histopathology of trematode infected fish *Channa striatus*. Biolife 1(1):29-31
166. Lenzi HL, Pelajo-Machado M, Vale BS, Machado-Silva JR, Paiva DD, Mota EM, Lenzi JA (1997) Confocal laser scanning microscopy applied to the study of parasitic and infectious agents. Cell Vision 4:196–197
167. Li C, Chung Y, Ko R (1999) The distribution of excretory/secretory antigens during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections. Parasitol Res 85:993–998
168. Li Y, Wang B, Zhu Y, Tian Z, Yang Z, Duan J, Wang Z (2020) The cysteine protease ATG4B of *Trichinella spiralis* promotes larval invasion into the intestine of the host. Vet. Res. 51(1):1-12
169. Lichtenfels JR, Murrell KD, Pilitt PA (1983) Comparison of three subspecies of *Trichinella spiralis* by scanning electron microscopy. J. Parasitol. 69:1131–1140
170. Littlewood DTJ, Rohde K, Clough KA (1999) The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. Biol. J. Linn. Soc. 66:75-114
171. Liu ZM, Wang C, An CL (1991) Differentiation of the sex of *Trichinella* larvae collected in Changchun. Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases 9(3):223–225
172. Lotz JM & Font WF (2008) Family Pleurogenidae Looss, 1899. In: Bray RA, Gibson DI, Jones A (eds) Keys to the Trematoda, vol 3. CAB International and Natural History Museum, Wallingford
173. Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC (1998) Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz 93(Suppl 1):303–307
174. Mair GR, Maule AG, Day TA, Halton DW (2000) A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. Parasitology 121(2):163–170
175. Mair GR, Maule AG, Fried B, Day TA, Halton DW (2003) Organization of the musculature of schistosome cercariae. J Parasitol 89(3):623–625

176. Mair GR, Maule AG, Shaw C, Johnston CF, Halton DW (1998) Gross anatomy of the muscle systems of *Fasciola hepatica* as visualized by phalloidin-fluorescence and confocal microscopy, *Parasitology* 117:75–82
177. Majoras G, Erdélyi K, Sztojkov VA (2000) *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea) metely elofordulasa Magyarországon (Translated title of the contribution: Occurrence of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea) in Hungary). *Magy. Allatorv. Lapja* 122:469–474
178. Malakauskas A & Kapel CM (2003) Tolerance to low temperatures of domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in rat muscle tissue. *J. Parasitol.* 89:744–748
179. Malakauskas A, Paulauskas V, Jarvis T, Keidans P, Eddi C, Kapel CM (2007) Molecular epidemiology of *Trichinella* spp. in three Baltic countries: Lithuania, Latvia, and Estonia. *Parasitol. Res.* 100:687–693
180. Marucci G, La Grange LJ, La Rosa G, Pozio E (2009) *Trichinella nelsoni* and *Trichinella* T8 mixed infection in a lion (*Panthera leo*) of the Kruger National Park (South Africa). *Vet. Parasitol.* 159:225–228
181. Masetti M, Locci T, Cecchetti A, Lucchesi P, Magi M, Malvaldi G, Bruschi F (2004) Nitric oxide synthase immunoreactivity in the nematode *Trichinella britovi*. Evidence for nitric oxide production by the parasite. *Int J Parasitol* 34:715–721
182. McVay CS, Tsung A, Appleton J (1998) Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 66(5):941-1945
183. Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani, Saleem MH, Rehman MU, Iqbal MK, Wang Y, Ahmad HI, Abbas T, Hussain R, Ghori MT, Ali S, Khan UA, Li J (2017) A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog.* 109:253–62
184. Mochalova NV, Terenina NB, Kreshchenko ND, Yashin VA, Nefedova DA, Nikogoyan MA, Petrosyan AR, Moysesyan SO (2019) *Dicrocoelium lanceatum* (Trematoda, Dicrocoelidae): the study of the neuro-muscular system. Theory and practice of parasitic disease control. International Scientific Conference, Moscow
185. Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11:227-256
186. Morales-Montor J, Colin-Oviedo A, González GM, Palma-Nicolás JP, Sánchez-González A, Nava-Castro KE, Domínguez-Ramírez L, García-Varela M, Del Río-Araiza VH, Hernández-Bello R (2022) Molecular identification of a PGRMC-2

- receptor in maturing oocytes of the zoonotic nematode parasite *Trichinella spiralis*. Vet. Parasitol. 302:109662
187. Morand S & Poulin R (1998) Density, body mass and parasite species richness of terrestrial mammals. *Evol Ecol* 12:717–727
 188. Moravec F & Justine J-L (2005) Two species of *Philometra* (Nematoda, Philometridae) from serranid fishes off New Caledonia. *Acta Parasitol.* 50(4):323–331
 189. Mukaratirwa S, La Grange L, Pfukenyi DM (2013) *Trichinella* infections in animals and humans in sub-Saharan Africa: A review. *Acta Tropica* 125:82– 89
 190. Murata Y, Nishiyama T, Ishizaka S (1998) Tomographical distribution of *Trichinella spiralis* (Ts) nuclei with laser scanning confocal microscopy (LSCM). *Parasitol Int* 47:294
 191. Murrell KD & Pozio E (2011) Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerg Infect Dis.* 17:2194-2202
 192. Murrell KD (2016) The dynamics of *Trichinella spiralis* epidemiology: Out to pasture? *Vet Parasitol* 231:92–96
 193. Nagano I, Wu Z, Matsuo A, Pozio E, Takahashi Y (1999) Identification of *Trichinella* genotypes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *Int. J. Parasitol.* 29:1113–1120
 194. Ndao M (2009) Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 278246
 195. Neumann M & Gabel D (2002) Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 50:437–439
 196. Nicol J, Turner S, Coyne D, den Nijs L, Hockland S, Maafi Z (eds.) (2011) *Current Nematode Threats to World Agriculture*, Springer, The Netherlands
 197. Norena C, Damborenea C, Brusa F (2015) Chapter 10 - Phylum Platyhelminthes. (Eds): Thorp JH & Rogers DC. In: Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates (Fourth Edition)*, Academic Press, pp. 181-203
 198. Oda T, Namba K, Maéda Y (2005) Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by x-ray fiber diffraction analysis. *Biophys J* 88:2727–2736
 199. Owen IL & Reid SA (2007) Survival of *Trichinella papuae* muscle larvae in a pig carcass maintained under simulated natural conditions in Papua New Guinea. *J. Helminthol.* 81:429–432

200. Owen IL, Sims LD, Wigglesworth MC, Puana I (2000) Trichinellosis in Papua New Guinea. *Aust. Vet. J.* 78:698–701
201. Pawley JB (Ed.) (2006) *Handbook of biological confocal microscopy*. New York, NY: Springer
202. Petrov A & Podvyaznaya I (2016) Muscle architecture during the course of development of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomidae) from cercariae to metacercariae. *J Helminthol* 90(3):321–336
203. Pina S, Russell-Pinto F, Rodrigues P (2011) Morphological and molecular study of *Microphallus primas* (Digenea: Microphallidae) metacercaria, infecting the shore crab *Carcinus maenas* from northern Portugal. *Folia Parasitol* 58(1):48–54
204. Pires-daSilva A (2007) Evolution of the control of sexual identity in nematodes. *Semin Cell Dev Biol* 18:362–370
205. Platonova T A & Galtsova VV (1976) *Nematodes and their Role in the Meiobenthos*. Nauka, Leningrad
206. Poinar GO Jr. (2010) Chapter 9 - Nematoda and Nematomorpha Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Third Edition) 237-276
207. Polaz S, Anisimova A, Labanouskaya P, Viarbitskaya A, Kudzelic V (2017) The role of wild and domestic ungulates in forming the helminth fauna of European bison in Belarus. *Eur. Bison Conserv. Newsl.* 10:79–86
208. Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanuev A, Ceron J (2012) Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation Published. *J. Vis. Exp.* 64:e4019
209. Poulin R. (1998) *Evolutionary Ecology of Parasites: From Individuals to Communities*. Springer Science & Business Media. Chapman & Hall, London, 212 pages
210. Pozio E & La Rosa G (1998) Short report: identification of the likely etiologic agent of human trichinellosis in Sicily (Italy) between 1933 and 1946. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:906–907
211. Pozio E & La Rosa G (2000) *Trichinella murrelli* n. sp: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *J. Parasitol.* 86:134–139
212. Pozio E & La Rosa G (2010) *Trichinella*. Liu D. (Ed.), *Molecular detection of foodborne pathogens*. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 851–863

213. Pozio E & Murrell KD (2006) Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv. Parasitol.* 63:367–439
214. Pozio E & Zarlenga D (2019) International Commission on Trichinellosis: Recommendations for genotyping *Trichinella* muscle stage larvae. *Food Waterborne Parasitol.* 15:e00033
215. Pozio E & Zarlenga D (2019) International Commission on Trichinellosis: Recommendations for genotyping *Trichinella* muscle stage larvae. *Food Waterborne Parasitol* 12:e00033
216. Pozio E & Zarlenga DS (2005) Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.* 35:1191–1204
217. Pozio E & Zarlenga DS (2013) New pieces of the *Trichinella* puzzle. *Int. J. Parasitol.* 43(12-13):983-997
218. Pozio E (2007) World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 149:3–21
219. Pozio E (2007a) Taxonomy, biology and epidemiology of *Trichinella* parasites. In: Dupouy-Camet, J., Murrell, K.D. (Eds.), *FAO/WHO/OIE Guidelines for the Surveillance, Management, Prevention and Control of Trichinellosis*. World Organisation for Animal Health Press, Paris, pp. 1–35
220. Pozio E, Foggin CM, Gelanew T, Marucci G, Hailu A, Rossi P, Gomez Morales MA (2007c) *Trichinella zimbabwensis* in wild reptiles of Zimbabwe and Mozambique and farmed reptiles of Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 143:305–310
221. Pozio E, Foggin CM, Marucci G, La Rosa G, Sacchi L, Corona S, Rossi P, Mukaratirwa S (2002) *Trichinella zimbabwensis* n.sp. (Nematoda), a new nonencapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. *Int. J. Parasitol.* 32:1787–1799
222. Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS (2009a) Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect Genet Evol* 9:606–616
223. Pozio E, Kapel CM, Gajadhar AA, Boireau P, Dupouy-Camet J, Gamble HR (2006) *Trichinella* in pork: current knowledge on the suitability of freezing as a public health measure. *Euro Surveill.* 11:E061116.1
224. Pozio E, Marucci G, Casulli A, Sacchi L, Mukaratirwa S, Foggin CM, La Rosa G (2004) *Trichinella papuae* and *Trichinella zimbabwensis* induce infection in

- experimentally infected varans, caimans, pythons and turtles. *Parasitology* 128:333–342
225. Pozio E, Owen IL, La Rosa G, Sacchi L, Rossi P, Corona S (1999) *Trichinella papuae* n. sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *Int. J. Parasitol.* 29:1825–1839
226. Pozio E, Owen IL, Marucci G, La Rosa G (2005b) Inappropriate feeding practice favors the transmission of *Trichinella papuae* from wild pigs to saltwater crocodiles in Papua New Guinea. *Vet. Parasitol.* 127:245–251
227. Pozio E, Pagani P, Marucci G, Zarlenga DS, Hoberg EP, De Meneghi D, La Rosa G, Rossi L (2005) *Trichinella britovi* etiological agent of sylvatic trichinellosis in the Republic of Guinea (West Africa) and a re-evaluation of geographical distribution for encapsulated species in Africa. *Int. J. Parasitol.* 35:955–960
228. Pozio E, Rinaldi L, Marucci G, Musella V, Galati F, Cringoli G, Boireau P, La Rosa G (2009) Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *Int. J. Parasitol.* 39:71–79
229. Pozio E, Verster A, Braack L, De Meneghi D, La Rosa G (1994) Trichinellosis south of the Sahara. In: Campbell, C.W., Pozio, E., Bruschi, F. (Eds.), *Trichinellosis*. ISS Press, Rome, Italy, pp. 527–532
230. Rankin JS (1939) Studies on the trematode family Microphallidae Travassos, 1921. I. The genus *Levinseniella* Stiles and Hassall, 1901, and description of a new genus, *Cornucopula*. *Trans Am Microsc Soc* 58(4):431–447
231. Refat M, Aqeel S, Grabtchev I (2004) Spectroscopic and physicochemical studies of charge-transfer complexes of some benzanthrone derivatives ‘luminophore dyes’ with iodine as σ -acceptor *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* 49:258–65
232. Rikovski AS (1995) On the mutual exchange of helminths between the elk and domestic sheep (with reference to *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 104:335–336
233. Roberts RJ, Smail DA (2012) Munro, E.S. Laboratory methods. In *Fish Pathology*, 4th ed.; R.J., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, West Sussex, United Kingdom 439–480
234. Rohde K (1996) Robust phylogenies and adaptive radiations: a critical examination of methods used to identify key innovations. *American Naturalist* 148:481–500

235. Romani M & Auwerx J (2021) Phalloidin Staining of Actin Filaments for Visualization of Muscle Fibers in *Caenorhabditis elegans*. Bio-protocol 11(19):e4183
236. Rozario T & Newmark PA (2015) A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. Exp Parasitol 158:31–41
237. Rozycki M, Korpysa-Dzirba W, Belick A, Pelec T, Mazurek J, Cencek T (2022) Analysis of a Trichinellosis Outbreak in Poland after Consumption of Sausage Made of Wild Boar Meat. Meat. J. Clin. Med. 11:485
238. Rubenina I, Gavarane I, Kirilova E, Mezaraupė L, Kirjusina M (2021) Comparison of the Benzanthrone Luminophores: They Are Not Equal for Rapid Examination of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea). Biomolecules 11(598):1-15
239. Ryzhova O, Vus K, Trusova V, Kirilova E, Kirilov G, Gorbenko G & Kinnunen P (2016) Novel benzanthrone probes for membrane and protein studies. Methods Appl Fluores 4:034007
240. Sah R, Khatri A, Kharel R, Kc H, Rabaan AA, Tiwari R, Dhama K, Malik YS, Donovan S, Rodriguez-Morales AJ, Muigg V, Neumayr A (2020) Case Report: Management of Dead Intraocular Helminth Parasites in Asymptomatic Patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 103(2):719–722
241. Samojlovskaja NA (2008) The comparative analysis of parasitofauna of spotty deers and lambs in national park “Losinyj island”. Russ. J. Parasitol. 4:13–15. (In Russian, with English summary)
242. Saville DH, Galaktionov KV, Irwin SWB, Malkova II (1997) Morphological comparison and identification of metacercariae in the ‘pygmaeus’ group of microphallids, parasites of seabirds in western palaeartic regions. J Helminthol 71(2):167–174
243. Schneckenburger, H, Richter V, Wagner M (2019) Live-Cell Optical Microscopy with Limited Light Doses 9781510622586
244. Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW (1999) Reduction of lipofuscinlike autofluorescence in fluorescently labeled tissue. J Histochem Cytochem 47:719–730
245. Šebelová Š, Stewart MT, Mousley A, Fried B, Marks NJ, Halton DW (2004). The musculature and associated intramolluscan stages of *Echinostoma caproni* (Trematod visualised by confocal microscopy. Parasitol Res 93:196–206
246. Šebelová Š, Stewart MT, Mousley A, Fried B, Marks NJ, Halton DW (2004) The musculature and associated innervation of adult and intramolluscan stages of

- Echinostoma caproni* (Trematoda) visualised by confocal microscopy. *Parasitol Res* 93(3):196–206
247. Segliņa Z, Bakasejevs E, Deksnis G, Spuņģis V, Kirjušina M (2015) New findings of *Trichinella britovi* in a European beaver (*Castor fiber*) in Latvia. *Parasitol Res* 114:3171–3173
248. Shemshadi B, Ranjbar-bahadori S, Delfan-abazari M (2017) Prevalence and intensity of parasitic infection in domestic ducks (*Anas platyrhynchos*) in Gilan Province, Northern Iran. *Comp. Clin. Pathol.* 26 (1):165–167
249. Shigin AA (1996) Morphological criteria of the species in cercaria of the genus *Diplostomum* (Trematoda: Diplostomidae) and methods for their study. *Parazitologija* 30:425–439
250. Shivraj B, Siddlingeshwar E, Kirilova EM, Belyakov SV, Divakar DD, Alkheraif AA (2018) Photophysical Properties of Benzanthrone Derivatives: Effect of Substituent, Solvent Polarity and Hydrogen Bonding. *Photochem Photobiol Sci* 17(4):453-464
251. Siddlingeshwar B, Hanagodimath SM, Kirilova EM, Kirilov GK (2011) Photophysical characteristics of three novel benzanthrone derivatives: Experimental and theoretical estimation of dipole moments. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 112:448–456
252. Skrjabin KI & Antipin DN. 1962. Superfamily Plagiorchioidea Dollfus, 1930. In: Skrjabin KI (ed). *Trematodes of Animals and Humans. Bases of Trematodology.* Vol 20. Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow
253. Skrjabin KI (1949) Trematodes of animals and human. In *Basic Trematodology.* Vol III; Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow-Leningrad, Russia, 63–66
254. Smith TG (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology* 82:565–585
255. Sorokovoi VI, Dobretsov GE, Mishnev VV, Klebanov GI, Vladimirov YA (1974) 3-Methoxybenzanthrone as Fluorescent Probe Sensitive to Conformational Changes of Proteins. *Biophysics* 19:30-33
256. Souza J, Garcia J, Neves RH, Machado-Silva JR, Maldonado A (2013) *In vitro* excystation of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) metacercariae assessed by light microscopy, morphometry and confocal laser scanning microscopy. *Exp Parasitol* 135:701–707

257. Souza J, Garcia JS, Manso PP, Neves RH, Maldonado A Jr, Machado-Silva JR (2011) Development of the reproductive system of *Echinostoma paraensei* in *Mesocricetus auratus* analyzed by light and confocal scanning laser microscopy. *Exp Parasitol* 128:341–346
258. Specht EA, Braselmann E, Palmer AE (2017) A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annu. Rev. Physiol.* 79:93–117
259. Stankiewicz M, Jonas W, Hadas E, Cabaj W, Douch PGC (1996) Supravital staining of eosinophils. *Int. J. Parasitol.* 26(4):445-446
260. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6:411–425
261. Stewart MT, Marks NJ, Halton DW (2003b) Neuroactive substances and associated major muscle systems in *Bucephaloides gracilescens* (Trematoda: Digenea) metacercaria and adult. *Parasitol Res* 91(1):12–21
262. Stewart MT, Mousley A, Koubková B, Marks NJ, Halton DW (2003a) Gross anatomy of the muscle systems and associated innervation of *Apatemon cobitidis* proterorhini metacercaria (Trematoda: Strigeidea), as visualized by confocal microscopy. *Parasitology* 126(3):273–282
263. Stewart MT, Mousley A, Koubková B, Šebelová Š, Marks NJ, Halton DW (2003c) Development in vitro of the neuromusculature of two strigeid trematodes, *Apatemon cobitidis proterorhini* and *Cotylurus erraticus*. *Int J Parasitol* 33(4):413–424
264. Sweeting RA (1974) Investigations into natural and experimental infections of freshwater fish by the common eye-fluke *Diplostomum spathaceum* Rud. *Parasitology* 69(3):291-300
265. Swiderski Z, Hichem K, Mackiewicz JS, Miquel J (2019) Functional ultrastructure and cytochemistry of vitellogenesis and mature vitellocytes of the digenean *Cainocreadium labracis* (Dujardin, 1845), parasite of *Dicentrarchus labrax* (L., 1758). *Parasitol. Res.* 118(2):493-504
266. Swislocka M, Borkowska A, Matosiu M, Czajkowska M, Duda N, Kowalczyk R, Ratkiewicz M (2021) Sex-biased polyparasitism in moose (*Alces alces*) based on molecular analysis of faecal samples. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 13:171–177
267. Takahashi Y (2021) Biology of *Trichinella*. In *Trichinella and Trichinellosis*, Academic Press. pp. 77-101

268. Takahashi Y, Furuki J, Yoshikawa Y, Yamada S, Araki T (1987) Sex-Differentiating Criteria for *Trichinella spiralis* Muscle. *Jpn. J. Parasitol.* 6(6):367-370
269. Takahashi YU, Yoshikawa YO, Kim HO, Aisaka AK, Yamada SH, Araki TS (1988) The morphological findings of *Trichinella spiralis* as revealed by PAS and AZAN stainings. *Jpn J Parasitol.* 37(4):242-247
270. Tarabara U, Kirilova E, Kirilov G, Vus K, Zhytniakivska O, Trusova V, Gorbenko, G (2021). Benzanthrone dyes as mediators of cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils. *J. Mol. Liq.* 324:115102
271. Teng X, Li F, Lu C (2020) Visualization of materials using the confocal laser scanning microscopy technique. *Chem Soc Rev* 49(8):2408-2425
272. Terenina NB, Kreshchenko ND, Mochalova NB, Movsesyan SO (2018) Serotonin and neuropeptide FMRFamide in the attachment organs of trematodes. *Helminthologia* 55(3):185-194
273. Terenina NB, Kreshchenko ND, Mochalova NV, Nefedova D, Voropaeva EL, Movsesyan SO, Demiaszkiewicz A, Yashin VA, Kuchin AV (2020) The New Data on the Serotonin and FMRFamide Localization in the Nervous System of *Opisthorchis felineus* Metacercaria. *Acta Parasitol.* 5(2):361-374
274. Tkach VV, Hope AG, Greiman SE (2019) Method for the Rapid Fixation of Gastrointestinal Helminths in Small Mammals. *Acta Parasitol.* 28:11686
275. Toledo & Fried B (2019) [Advances in Experimental Medicine and Biology] Digenetic Trematodes Volume 1154 || Epidemiology of Trematode Infections: An Update. 10.1007/978-3-030-18616-6(Chapter 12), 359–409
276. Tompkins DM, Dunn AM, Smith MJ, Telfer S (2011) Wildlife diseases: From individuals to ecosystems. *J. Anim. Ecol.* 80:19–38
277. Torgerson PR & Macpherson CN (2011) The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet Parasitol.* 182:79–95
278. Transidico P, Bianchi M, Capra M, Pelicci PG, Faretta M (2004) From mcells to tissues: Fluorescence confocal microscopy in the study of histological samples. *Microsc Res Techniq* 64:89–95
279. Trusova VM, Kirilova E, Kalnina I., Kirilov G, Zhytniakivska OA, Fedorov PV, Gorbenko GP (2012) Novel Benzanthrone Aminoderivatives for Membrane Studies. *J Fluoresc* 22:953–959

280. Tso M, Liblik K, Farina JM, Baranchuk A (2022) Trichinellosis & Heart. In Neglected Tropical Diseases and other Infectious Diseases affecting the Heart, Academic Press pp. 117-124
281. Tyler S & Hooge M (2004) Comparative morphology of the body wall in flatworms (Platyhelminthes). *Can. J. Zool.* 82:194–210
282. Tyler S & Tyler MS (1997) Origin of the epidermis in parasitic Platyhelminths. *Int. J. Parasitol.* 27:715–738
283. Van Cleave HJ (1953) Acanthocephala of North American mammals. Illinois Biol. Monogr 23:1-179
284. Villella JB (1966) Morphologic criteria for distinguishing the sex of *Trichinella spiralis* larvae from muscle. *J Parasitol* 52:908–910
285. Vojtkova L & Roca V (1993) Parasites of the frogs and toads in Europe. Part I: Protozoa. *Rev. Esp. Herp.* 37-45
286. Vojtkova L (1990) Research into the parasitofauna in amphibians in Europe part I: Parasitofauna of frogs in the individual countries. *Scripta* 20:477-493
287. Vus K, Girysh M, Gorbenko G, Kinnunen P, Kirilova E, Kirilov G, Adachi E, Saito H (2014a) Association of novel benzanthrone dyes with amyloid fibrils: A resonance energy transfer study. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 68:189–196
288. Vus K, Trusova V, Gorbenko G, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I, Kinnunen P (2012) Novel aminobenzanthrone dyes for amyloid fibril detection, *Chem. Phys. Lett.* 532:110–115
289. Vus K, Trusova V, Gorbenko G, Sood R, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I, Kinnunen P (2014b) Fluorescence investigation of interactions between novel benzanthrone dyes and lysozyme amyloid fibrils. *J. Fluoresc.* 24:493–504
290. Wagner M & Horn H (2017) Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnol Bioeng.* 114(7):1386-1402
291. Wang F, Chen B, Yan B, Yin Y, Hu L, Liang Y, Song M, Jiang G (2019) Scattered light imaging enables real-time monitoring of label-free nanoparticles and fluorescent biomolecules in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* 141(36):14043-14047
292. Wang JZ, Jiang YL, Yang WT, Shi CW, Huang HB, Sun H, Liu GS, Wang CF, Yang GL, Cai YA (2018) Vaccination with DNA encoding ES 43-kDa/45-kDa antigens significantly reduces *Trichinella spiralis* infection in mice. *Vet. Sci. Res.* 120:4-10

293. Weller TH (1943) The structure of the larvae of *Trichinella spiralis* in rollfirtube tissue cultures. Am. J. Pathol. 19(3):503
294. World Health Organisation. Foodborne disease burden Epidemiology Reference Group. In WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases; World Health Organisation: Geneva, Switzerland, 2015
295. World Health Organisation. Schistosomiasis Fact Sheet; World Health Organisation: Geneva, Switzerland, 2019
296. World Health Organization. Available online: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/, mājaslapa apmeklēta 16 Feb 2022
297. Yang X, Liu W-H, Jin W-J, Shen G-L, Yu R-Q (1999) DNA binding studies of a solvatochromic fluorescence probe 3-methoxybenzanthrone. Spectrochim Acta A 55:2719–272
298. Zaičenko A (2014) 3-N-(2-hloracetamido)benzantrona iegūšana un atvasinājumu sintēze. Maģistra darbs. Rīgas Tehniskā Universitāte, Rīga p. 41
299. Zarlenga D, Thompson P, Pozio E (2020) *Trichinella* species and genotypes. Vet. Sci. Res. J. 133:289–296
300. Zarlenga DS, Aschenbrenner RA, Lichtenfels JR (1996) Variations in microsatellite sequences provide evidence for population differences and multiple ribosomal gene repeats within *Trichinella pseudospiralis*. J. Parasitol. 82:534–538
301. Zarlenga DS, Chute MB, Martin A, Kapel CM (1999) A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. Int. J. Parasitol. 29:1859–1867
302. Zarlenga DS, Rosenthal BM, La Rosa G, Pozio E, Hoberg EP (2006) Post-Miocene expansion, colonization, and host switching drove speciation among extant nematodes of the archaic genus *Trichinella*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:7354–7359
303. Zhytniakivska O, Trusova V, Gorbenko G, Kirilova E, Kalnina I, Kirilov G, Molotkovsky J, Tulkki J, Kinnunen P (2014a) Location of novel benzanthrone dyes in model membranes as revealed by resonance energy transfer. J. Fluoresc. 24:899–907
304. Zhytniakivska O, Trusova V, Gorbenko G, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I, Kinnunen P (2014b) Newly synthesized benzanthrone derivatives as prospective fluorescent membrane probes. J Lumin 146:307–313

305. Zondervan R, Kulzer F, Kolchenk MA, Orrit M (2004) Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Levels. *J. Phys. Chem. A* 108:1657-1665
306. <https://fauna-eu.org/> (sistemātikas aprakstīšanai, mājaslapa apmeklēta 17 Feb 2022)
307. https://statistika.spkc.gov.lv/pxweb/lv/Health/Health__Saslimstiba_Slimibu_Izplata__Infekcijas_un_parazitaras_slimibas/INF020_Infekcijas%20slimibas%20pa%20menesiem.px/table/tableViewLayout2/, mājaslapa apmeklēta 17 Feb 2022
308. <https://www.thermofisher.com/lv/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/microscopy-protocol/actin-staining-protocol.html>, mājaslapa apmeklēta 16 Feb 2022
309. <https://www.sigmaaldrich.com/LV/en/product/sigma/p1951>, mājaslapa apmeklēta 16 Feb 2022

PUBLIKĀCIJAS

I

Article

Comparison of the Benzanthrone Luminophores: They Are Not Equal for Rapid Examination of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea)

Ilze Rubenina *, Inese Gavarane, Elena Kirilova, Ligita Mezaraupe and Muza Kirjusina

Institute of Life Sciences and Technology, Daugavpils University, Parades Street 1A, LV-5401 Daugavpils, Latvia; inese.gavarane@du.lv (I.G.); jelena.kirilova@du.lv (E.K.); ligita.mezaraupe@du.lv (L.M.); muza.kirjusina@du.lv (M.K.)

* Correspondence: ilze.rubenina@du.lv; Tel.: +371-27131498

Abstract: Luminescent derivatives of benzanthrone are becoming more useful based on their light-absorbing and fluorescent-emitting properties. Our previous studies showed that luminescent staining properties of the same benzanthrone dye differ for variable parasite samples. Therefore, two types of benzanthrone dyes were prepared. One has a strongly basic amidine group and a halogen atom, and the other has an amide moiety and a tertiary amine group. Trematoda *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* is a liver fluke of a moose (*Alces alces*) and has a significant influence on the health and abundance of the moose population. Staining protocols for parasite *P. fasciolaemorpha* specific organ or organ systems imaging are mostly time-consuming and labor-intensive. The study aimed to compare the fixation technique and the staining protocol by synthesized benzanthrone luminescent dyes to determine detailed morphology, anatomical arrangement of the organ systems and gross organization of the muscle layers of *P. fasciolaemorpha* using confocal laser scanning microscopy. Luminophores were tested for samples fixed in different fixatives. Developed dyes and staining protocol resulting in imaging of all parts of trematode without additional sample preparation procedures, which usually are required for parasite examination. Obtained results confirmed that the most qualitative results could be reached using 3-N-(2-piperidinylacetamido)benzanthrone dye which has amide moiety and a tertiary amine group. Based on obtained results, 3-N-(2-piperidinylacetamido)benzanthrone gave more qualitative parasite visualization than 2-bromo-3-N-(N',N'-dimethylformamidino)benzanthrone.

Keywords: *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*; trematode; moose; benzanthrone luminescent dye; confocal laser scanning microscopy

Citation: Rubenina, I.; Gavarane, I.; Kirilova, E.; Mezaraupe, L.; Kirjusina, M. Comparison of the Benzanthrone Luminophores: They Are Not Equal for Rapid Examination of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea). *Biomolecules* **2021**, *11*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Anna Kurzyńska-Kokorniak

Received: 20 March 2021

Accepted: 15 April 2021

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Luminescent dyes are becoming popular to label specific biological processes, structures, and molecules [1,2]. Therefore, improvements in dye chemistry are required for the discovery of the helminth's detailed structure. In a previous investigation by Kirilova et al. [3], various benzanthrone derivatives (with substituted amidine or amine groups in 3-position of benzanthrone core) were applied for visualization of the internal and external structure of freshwater trematodes species such as *Diplostomum spathaceum*, *Diplodiscus subclavatus* and *Prosoctococcus confusus*. Studied benzanthrone dyes, using AFA fixative, showed good visualization of internal organ systems and body wall of parasites. Additionally, developed luminescent dye 3-N-(2-pyrrolidinoacetamido) benzanthrone was applicable for callus embryo detection [4]. We can explain the obtained results by specific intermolecular interaction between the applied dye molecules and the stained tissues. As it is known that the benzanthrone core, consisting of four fused aromatic rings, has a

strong hydrophobicity, primarily interacts with the most lipophilic parts of tissues, namely, with the lipids of cell membranes. At the same time, the dye molecules also contain basic polar groups, which allow them to interact (especially after their protonation with an acidic fixative) with negatively charged groups of tissues, mainly with proteins. Obviously, this combination of interactions of different types contributes to good staining and visualization of the investigated samples. Additionally, benzanthrone luminescent dyes are more photostable, and the development of such slides is required not only for research needs but also for training material preparation. Another important step in a staining protocol creation is sample fixation. The aim of fixation is to keep cellular and extracellular structures as close as possible to the parasite's structure *in vivo* and to prevent damages caused by autolysis [5]. The commonly used fixation solutions for further trematodes staining are the ethanol solutions [6]; the Bouin's solution [7–9]; the Carnoy's solution [10–13]; the 10% neutral-buffered formalin [14], and the alcohol-formaldehyde-acetic acid (AFA) [15,16]. The choice of applicable staining method and appropriate fixative depends on the study object. The incorrect staining or fixation method has an influence on the interpretation of study results [17]. Continued development of laser technology, digital imaging methods, the availability of brighter and more photostable fluorescent probes and the confocal laser scanning microscopy (CLSM) have made feasible novel experimental approaches for various label fluorescence, multidimensional and live-cell imaging, and microscopy [18]. The improvement of microscopy approaches gives more detailed information about parasite's organ systems, ultrastructural data for muscle fibers, cell bodies, detailed information about general morphology and gross anatomical arrangement of the organ systems [19,20]. Moreover, CLSM allows re-examining already mounted specimens from helminthological collections [21]. The process of staining is important for the understanding of the parasite's morphology and species identification. There are numerous staining methods, starting from old and more natural dyes such as carmine and saffron and ending with unnatural dyes, hematoxylin and synthesized aniline dyes [22,23]. Staining protocols using commercially available dyes for CLSM usually are complex and time-consuming, as at least two days are required to obtain results [24]. Through developing specific benzanthrone luminophores for biological object staining, we are suggesting simple and rapid staining protocols that would take up to 20 min.

Moose (*Alces alces*) is a wild definitive host of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Ejmont, 1932) [25]. The hepatic Trematoda parasite is a causative agent of parafasciolopsosis [26–28]. The moose liver fluke was first detected in 1932 in Eastern Europe. Nowadays, the parasite was found in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Poland [29] and in moose from Belarus [30], from Latvia [31,32], from north-western Russia [33] and from Poland [34]; in red deer (*Cervus elaphus*) from Hungary [35] and from Belarus, and in European bison (*Bison bonasus*) from Belarus [30]. The parasite is leaf-shaped or lanceolate (about 3–7 mm in length and about 1–2.5 mm in width) [36,37]. Moose become infected by ingestion of parasite, which can be swallowed with contaminated water or grass near water basins [34,38–39]. Mature flukes are found in bile ducts, duodenum, and pancreas [28,34,37]. *P. fasciolaemorpha* impact on moose mortality has been clarified in several studies [26–28]. Presence of the infection of *P. fasciolaemorpha* in moose has a significant impact on the health of the individual and a potential threat to domestic animals [29]. The present work was aimed to compare the fixation technique and the staining protocol by synthesized benzanthrone luminescent dyes for determination of detailed morphology, anatomical arrangement of the organ systems and gross organization of the muscle layers for *P. fasciolaemorpha* using CLSM.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of Fluorophore 2-Bromo-3-N-(N',N'-Dimethylformamidino)benzanthrone

The molecular formula of 2-bromo-3-N-(N',N'-dimethylformamidino)benzanthrone (AM323) is $C_{20}H_{15}BrN_2O$. The molecular weight is $379.26 \text{ g mol}^{-1}$. The dye AM323 was

obtained from 3-amino-2-bromobenzanthrone accordingly to the described procedure [40].

2.2. Synthesis of Fluorophore 3-N-(2-Piperidinylacetamido)benzanthrone

The molecular formula of 3-N-(2-piperidinylacetamido)benzanthrone (AZPP) is $C_{24}H_{22}N_2O_2$. Molecular weight is $370.46 \text{ g mol}^{-1}$. The dye AZPP was prepared from 3-(2-chloroacetamido)benzanthrone accordingly to the described method [41].

2.3. Fluorescence Measurements

Spectral parameters were measured in eight organic solvents: hexane, benzene, chloroform (CHCl_3), ethyl acetate (EtOAc), acetone, ethanol (EtOH), N,N-dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), and in PBS buffer (pH = 7.4) for solutions with concentrations 10^{-5} M at an ambient temperature in 10 mm quartz cuvettes. All solvents were of p.a. or analytical grade. The absorption spectra were obtained using a UV-visible spectrophotometer Specord® 80 (Analytik Jena AG, Germany). The fluorescence emission spectra were recorded on an FLSP920 (Edinburgh Instruments Co., Ltd., Scotland, Edinburgh) spectrofluorometer using 3-methoxybenzanthrone (QS = 0.56 in acetone [42]) as the reference luminophore [43].

2.4. Collection of Adult Parafasciolopsis fasciolaemorpha







Adult Trematoda worms were collected from naturally infected moose (*Alces alces*) livers in the 2018 autumn. Obtained livers were unhealthy; bile ducts were expanded and clogged; cavities were filled with dark yellow liquid. The bile duct and its cavities were cut to collect dark yellow liquid containing parasites. The slimy liquid was rinsed with physiological solution several times until the parasites were completely washed off.

2.5. Chemical Fixation

The fixation process is used to prepare parasites for dye binding. Subsequently, the obtained trematodes were fixed in six chemical fixatives. The chemicals, their amounts, pH, fixation and post-fixation times used in this study are shown in Table 1. Fixation was performed at room temperature for all specimens.

Table 1. Description of specimen fixation and storage conditions.

Chemical Fixative	Chemical Fixative					
	70% Ethanol	96% Ethanol	AFA Solution	Carnoy's Solution	Bouin's Solution	10% Neutral Buffered Formalin
Content of chemical fixative	70% ethanol	96% ethanol	(17:2:1) 85% ethanol; 40% formalin; glacial acetic; pH = 4.5	6:3:1 absolute ethanol; chloroform; glacial acetic acid	(15:4:1) picric acid, saturated aqueous solution; 40% formalin; glacial acetic acid	40% formalin; distilled water; sodium dihydrogen phosphate; sodium hydrogen phosphate
Time of fixation	Until examination	Until examination	2 h	2 h	2 h	Until examination

						
Washing	N/A	N/A	70% ethanol	70% ethanol	70% ethanol	N/A
Chemical fixative	70% ethanol	96% ethanol	70% ethanol	70% ethanol	70% ethanol	10% neutral buffered formalin
Storage	4 °C until required					
N/A not applicable						

2.6. Staining Procedure for *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*

Adult Trematoda worms, which were fixed in various chemical fixatives, were used for the staining. The worms were stained with benzanthrone dyes: AM323 and AZPP for 15 min. Then the specimens were washed with 96% ethanol after they were placed in ethanol-xylene (1:1) solution for 8–10 min and cleared by 30 s–3 min with 100% xylene to obtain appropriate transparency controlled under stereomicroscope SMZ800 (Nikon, Japan). Specimens were mounted in the Canada balsam (Sigma-Aldrich) and then were covered with a coverslip (24 × 24 mm), dried and kept in the dark until examination.

2.7. Confocal Laser Scanning Microscopy

Finally, the specimens were examined under high-speed multiphoton CLSM Nikon Eclipse Ti-E configured with an A1 R MP microscope system and equipped with a digital sight DS-U3 camera (Nikon, Japan). Slides were observed at various magnifications, from ×40 up to ×600. Autofluorescence was measured with 405 with filter 425–580 nm and 488 nm with filter 500–655 nm wavelengths, and to excite autofluorescence, equal intensities were used. An internal spectral detector performed the registration of the fluorescence signal. The start wavelength for the fluorescence signal registration was chosen to be 20 nm higher than the excitation wavelength until the edge of visible red spectra. Fluorescence was induced by using the following excitation laser wavelengths: (i) $\lambda = 488$ nm with the FITC filter (500–550 nm) and (ii) $\lambda = 638$ nm with Cy5 filter (662–737 nm). NIS Elements Advanced Research 3.2 64-bit software (Nikon, Japan) was used to process data from CLSM, to make snapshots, Z-stacks (with a 0.9 μm Z step size). The morphological measurements were carried out with a computer program NIS Elements AR Analysis 3.2 64-bit.

3. Results

3.1. Synthesis

According to the literature and our previous research on the luminescent dyes' design, benzanthrone derivatives are known as environmentally sensitive fluorophores exhibiting bright from green to red fluorescence depending on their chemical structure both in solutions and in the solid state.

For the development of new efficient luminescent benzanthrone dyes, various organic chemistry methods and synthetic procedures are applied using mainly as initial substances 3-aminobenzanthrone or its derivatives. One of the applied synthesis methods is based on the condensation reaction between the primary amino group of 3-aminobenzanthrone or 3-bromo-9-aminobenzanthrone with appropriate unsubstituted and substituted amides in the presence of a dehydrating reagent (phosphorus oxychloride),

resulting in new luminescent 3-amidino derivatives [44,45]. The main technique for preparing novel substituted 3-amido dyes is the nucleophilic substitution of the chlorine atom in 3-N-(2-chloroacetamido)benzanthrone by the reaction with an appropriate heterocyclic secondary amine in 1,4-dioxane as solvent resulting in corresponding tertiary heterocyclic amidoamine [41]. In the current research, two novel highly emissive perspective benzanthrone dyes with amidine group (AM323) and with substituted amide group at 3-position of benzanthrone system (AZPP) were selected for visualization purposes.

2-bromo-3-aminobenzanthrone was used as the initial substance for the preparation of fluorophore AM323 by condensation reaction with N,N-dimethylformamide in the presence of phosphorus oxychloride. Obtained red-colored dye is soluble in many polar and non-polar organic solvents.

A second dye, AZPP, was obtained from 3-(2-chloroacetamido)benzanthrone in reaction with piperidine in 1,4-dioxane solution. The prepared yellow-colored dye has better solubility in non-polar organic solvents. Both compounds have excellent emitting properties.

3.2. Photophysical Parameters

To fully characterize the prepared luminescent compounds, their optical properties were studied in various media. The UV/vis absorption spectra and fluorescence characteristics (spectra, quantum yields, Stokes shifts) of studied dyes have been recorded in eight organic solvents with a wide range of polarities and in water (PBS buffer, pH = 7.4). The data of absorption and emission band maxima are summarized in Table 2.

Table 2. Photophysical parameters of the investigated fluorophores.

Solvent	Dielectric Constant	AM323				AZPP			
		Absorption λ_{abs} (lg ϵ), nm	Emission λ_{em} , nm	Φ_0	Stokes Shift, cm^{-1}	Absorption λ_{abs} (lg ϵ), nm	Emission λ_{em} , nm	Stokes Shift, cm^{-1}	
Hexane	1.89	430 (2.68)	523	0.25	4135	442 (2.62)	531	0.12	3792
Benzene	2.28	446 (2.90)	558	0.23	4500	447 (2.72)	549	0.17	4156
CHCl ₃	4.70	447 (2.94)	593	0.32	5508	445 (2.88)	561	0.58	4647
EtOAc	6.02	448 (2.88)	576	0.23	4960	438 (2.91)	545	0.32	4482
Acetone	20.70	448 (2.87)	603	0.15	5738	438 (2.95)	554	0.57	4781
EtOH	24.30	464 (2.80)	660	0.01	6400	430 (2.97)	562	0.70	5462
DMF	36.70	464 (2.83)	624	0.03	5526	439 (2.92)	661	0.57	7650
DMSO	49.00	465 (3.00)	627	0.02	5556	434 (2.96)	570	0.58	5498
PBS buffer	79.00	469 (2.97)	667	0.01	6329	433 (2.98)	658	0.07	7897

In general, it could be seen that absorption spectra do not show substantial variations with solvents: a bathochromic shift in the absorption spectra on changing the solvent from hexane to dimethyl sulfoxide is 35 nm for fluorophore AM323, but for dye AZPP the hypsochromic shift (only 8 nm) is observed. For both studied substances the positions of absorption maxima are situated between 430–465 nm.

The effect of polarity of the solvent on fluorescence is more pronounced than on the absorption spectrum: as the emission spectrum reveals positive solvatochromism when going from non-polar hexane to polar solvent (ethanol, DMF, or DMSO). This is typical spectral behavior for fluorophores with intramolecular charge transfer, which leads to a large dipole moment in the excited state and high emission parameters sensitivity to the

polarity of the surrounding [43]. The dye AM323 displays a large bathochromic shift (137 nm) of fluorescence maximum on changing the solvent from hexane (523 nm) to ethanol (660 nm). But dye AZPP demonstrates higher fluorescence bathochromic shift (130 nm), changing the solvent from hexane (531 nm) to dimethylformamide (661 nm). Such a difference between the studied fluorophores can be explained by the specific interaction of the dye molecule with the solvent molecules due to the amino group's different basicity and the amidino group.

An important photophysical characteristic of fluorescent dye is Stokes shift—difference between positions of the band maxima of the absorption and emission spectra. Stokes shift represents differences in the equilibrium geometries (bond lengths, angles, torsional angles, and vibrational frequencies) of the ground and excited states, i.e., the internal reorganization energy [43].

As seen from Table 2, the Stokes shifts are higher in the case of more polar solvents, indicating distinguished stabilization of the excited state in these solvents.

The maximal Stokes shift value for organic solvents is observed for fluorophore AZPP (up to 222 nm ($\sim 7650\text{ cm}^{-1}$) in dimethylformamide solution). However, for AM323 it is 196 nm ($\sim 6400\text{ cm}^{-1}$) in ethanol.

3.3. Chemical Fixation

In the course of the experiment, 30 trematodes were used for each combination of chemical fixative (in total, six chemical fixatives) and luminophore (in total, two benzanthrone luminophores). Three biological replicates were done during this study. Overall, 1080 trematodes were used for the entire experiment.

It was observed that the specimens' overall morphology was not changed during the fixation in all cases. None of the fixed samples changed the color after fixation, but the specimen was fixed in Bouin's solution. As Bouin's solution contains picric acid, the color of the fixative is yellow, which means that all samples were dyed in yellow. The chemical fixative assessment was performed twice: at the end of the sample preparation process to assess if there are physical changes of trematodes and during microscopy to assess which combination of benzanthrone dye and fixative is the most appropriate (please refer to Table 3).

Table 3. Comparison of chemical fixatives.

Chemical fixative	Physical Changes in Specimen	Comments
70% ethanol	–	Optimal concentration of ethanol for trematode sample fixation, no damages to the sample, sample after fixation became a little darker
96% ethanol	+	Specimen became robust; challenging to squeeze between coverslip and slide, sample after fixation became a little darker
AFA solution	–	No physical changes in the specimen were observed
Carnoy's solution	+	Specimen became impregnated with fixative, which caused enlargement of sample (data not shown)
Bouin's solution	+	Fixative did not washout; specimen turned yellow
10% neutral buffered formalin	–	No physical changes in specimen observed

– physical changes in specimen was not observed

+ physical changes in specimen was observed

3.4. Staining and Examination of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*

Staining of parasites was performed in parallel for direct comparison of both dyes. Each fixed trematode was stained 3 times with the same benzanthrone dye.

AZPP dye provided excellent imaging of the whole body of trematode in 40× magnification. The surface, along with spikes, was observed in good quality, oral and ventral suckers were easily detected, the spatial (dimensional) structure was visualized. All three muscle layers-circular, diagonal and longitudinal, were observed at the same time in 100× magnification. In the arrangement of the oral and ventral suckers' muscle fibers besides circular and longitudinal muscle fibers, also radial muscle layer was visualized. Tegument was visualized in detail like a regular net that covered the parasite. The area where the spike connected to the tegument was visualized. Clear visible parenchyma cells were observed in the tail area. Oral sucker continued in short prepharynx then in the pharynx. The esophagus was split into two caeca. No diverticula were observed, the intestine was smooth. The excretory bladder was clearly visible. The reproductive system was imagined in detail. Radial muscles, cirrus channel, spikes on cirrus surface were observed. The ovary was observed only in few specimens. Uterus was poorly visualized and only with AZPP dye and 70% ethanol combination. Due to fixative eggs were flattened and were observed in the uterus. Vitellaria created follicles located dorsal against the intestine, on both sides of the body, starting from the esophagus to the posterior end. Two irregular testes located under the ventral sucker were observed. Compared to AZPP, the AM323 provided much poorer results. The obtained data are summarized in Table 4. The entire body and structure of the suckers were not clear. Spikes were observed but without visualization of spatial structure. All three muscle fiber types-circular, diagonal, and longitudinal, were observed in 600× magnification, not in 100× magnification. Muscles of suckers as well as tegument were not visualized. Digestive tract: pre-pharynx, pharynx, esophagus, and intestines were obtained in poor quality. From the reproductive system, good visualizations of cirrus, eggs, and testis, vitellaria, ovary and uterus were not detected.

Table 4. Comparison of fixatives and benzanthrone dye results obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Characteristic	Benzanthrone Dye	Confocal Microscopy Results Observed (+)/Not Observed (-)					
		Chemical Fixative					
		70% Ethanol	96% Ethanol	AFA Solution	Carnoy's Solution	Bouin's Solution	10% Neutral Buffered Formalin
Contours of the whole body are well outlined	AZPP	+	-	+	-	+	+
	AM323	+	-	+	+	-	-
Spikes and layout on the surface are well outlined	AZPP	+	+	+	+	+	-
	AM323	-	-	+	+	-	-
Spatial structure of spikes	AZPP	+	-	+	-	-	-
	AM323	-	-	-	-	-	-
Tegument	AZPP	+	-	-	-	-	+
	AM323	-	-	-	-	-	-
Muscle layers of the body (circular, diagonal, and longitudinal) at the same magnification	AZPP	+	-	+	+	-	-
	AM323	-	-	+	+	-	-
	AZPP	+	-	-	-	-	-

Muscle fibers of oral sucker, radial symmetry	AM323	-	-	-	-	-	-
Muscle fibers of ventral sucker, radial symmetry	AZPP	+	-	-	-	-	-
Pharynx, muscle fibers of it can be easily distinguished	AM323	-	-	+	-	-	-
Esophagus can be easily distinguished	AZPP	+	-	+	-	-	-
Intestine can be easily distinguished	AM323	+	-	+	-	-	-
Parenchyma cells are well outlined	AZPP	-	-	-	+	-	-
Cirrus is well outlined	AM323	-	-	+	+	-	-
Ovary is well outlined	AZPP	+	-	-	-	-	-
Uterus filled with eggs	AM323	-	-	-	-	-	-
Vitellaria is well outlined	AZPP	-	-	-	-	-	+
Testis can be easily distinguished	AM323	-	-	+	-	-	-
Total +/- (16)	AZPP	13/3	2/14	8/8	2/14	2/14	3/13
Total +/- (16)	AM323	2/14	0/16	7/9	4/12	1/15	0/16

- specified characteristic was not observed

+ specified characteristic was observed

+/- ratio of total pluses against total minuses

P. fasciolaemorphia are relatively thick compared to other trematodes species, e. g. *Prototocus confusus*, which means that during the fixation process, the *P. fasciolaemorphia* specimen impregnated more Bouin's or another fixatives than thicker trematodes. After the fixation in Bouin's solution, it was observed that fixative could not be washed out completely, and during the confocal microscopy, fixative's has a major impact on data quality. Based on various benzanthrone dye and chemical fixative combinations experiments, the experiments highlighted that AZPP and 70% ethanol following AZPP and AFA combinations were the most suitable for parasite's imaging.

The developed method using synthesized AZPP benzanthrone dye is applicable for *P. fasciolaemorphia* examination, make staining protocols less labor-intensive and time-consuming to save resources.

4. Discussion

Nowadays, fluorescence bioimaging based on emissive organic molecules has gained great attention as an indispensable tool in research to visualize tissue structures. The spectral changes observed on the binding of fluorophores with cell structures are an important tool for investigating these issues. It becomes necessary to continuously search for new compounds and synthesize new fluorescent dyes covering a wide spectral range of excitation and emission. Therefore, considerable efforts are focused on the development, synthesis, and properties of new luminescent dyes. But the synthesis of new luminescent markers still has several challenges to provide low-toxic dyes for biological objects. In literature, there are described various Trematoda stainings methods such as Gower's carmine [24], Ehrlich's acid hematoxylin and Celestin blue-b [13] actin-antibodies and

fluorescently labeled phalloidin staining [46–48]. Recently we reported that benzanthrone dyes are a useful tool for imaging freshwater trematodes [3], for callus embryo determination [4] and for sex determination of *Trichinella* larva [49]. Therefore, we continue our research on the synthesis of new benzanthrone markers that bind to actin elements to determine internal organs and systems of trematodes.

Derivatives of benzanthrone are well known as p-conjugated compounds with donor–acceptor architectures. Modification of benzanthrone structure has given rise to the synthesis of many derivatives with tenable optical properties. They are typical intramolecular charge transfer luminophores. The optical properties of such molecules depend mainly on the polarizability of the electrons localized in p-bonding molecular orbitals [43]. The polarizability of a molecule is determined mainly by its chemical structure, particularly by the length and the structure of the p-conjugated spacer and the electronic nature of the donors and acceptors attached. As is known, the photophysical properties of 3-substituted benzanthrone derivatives mainly depend on the electron-donating properties of groups connected to nitrogen atoms at the C-3 position [42].

In our previous research, we synthesized several benzanthrone derivatives with various chemical groups such as substituted amidines, secondary and tertiary amines, substituted aminoamides etc. [1,41,44]. These substances luminescence intensely, have high quantum yields, and their spectral properties are sensitive to the local microenvironment's polarity enabling sensing applications. The spectral properties of the developed fluorescent dyes were investigated in detail [3,4]. As a result, two promising compounds were selected for the current research of the possibilities of studying parasites. In line with our previous studies mentioned before, we prepared AZPP and AM323.

For synthesized derivatives, spectral analysis was undertaken, such as absorption spectra, steady-state fluorescence spectra, Stokes and solvatofluorochromic shifts and emission quantum yields were evaluated and analyzed (Table 2). Developed fluorophores have bright emission in organic solvents from green color in non-polar media to red fluorescence in a polar environment, thus showing excellent fluorosolvatochromism, i. e., sensitivity to the polarity of the medium, that results from solvent relaxation during the excited-state lifetime caused by the essential change of the dye dipole moment after excitation. Parasites need to develop specialized attachment organs for ecto- and endoparasitic survival. Hence a well-developed muscular system is essential. The system provides locomotion, specific feeding, reproduction, and attachment ability within-host [46,47,50,51]. Therefore, synthesized dyes have large Stokes shifts and can be used in super-resolution microscopy of various biological structures. Based on the results obtained, it can be concluded that the developed fluorophores can be used in super-resolution microscopy because super-resolution imaging methods need fluorescent dyes with large Stokes shifts [52]. In continuation of our further work, the developed luminescent dyes were used to visualize *P. fasciolaemorphia* trematode.

Experimental results showed that using laser excitation of 488 nm (with filter 500–655 nm), it was possible to achieve 23-fold attenuation of the autofluorescence signal if we compared it with 405 nm (with filter 425–580 nm) wavelength excitation. To evaluate the autofluorescence, several regions of interest (ROI) were selected, and these were compared to background ROI. Based on obtained data, a 488 nm laser with the FITC filter (500–550 nm) and a 638 nm laser with Cy5 filter (662–737 nm) were the most convenient lasers to suppress unwanted autofluorescence. The autofluorescence image of the sample is shown in Figure 1.

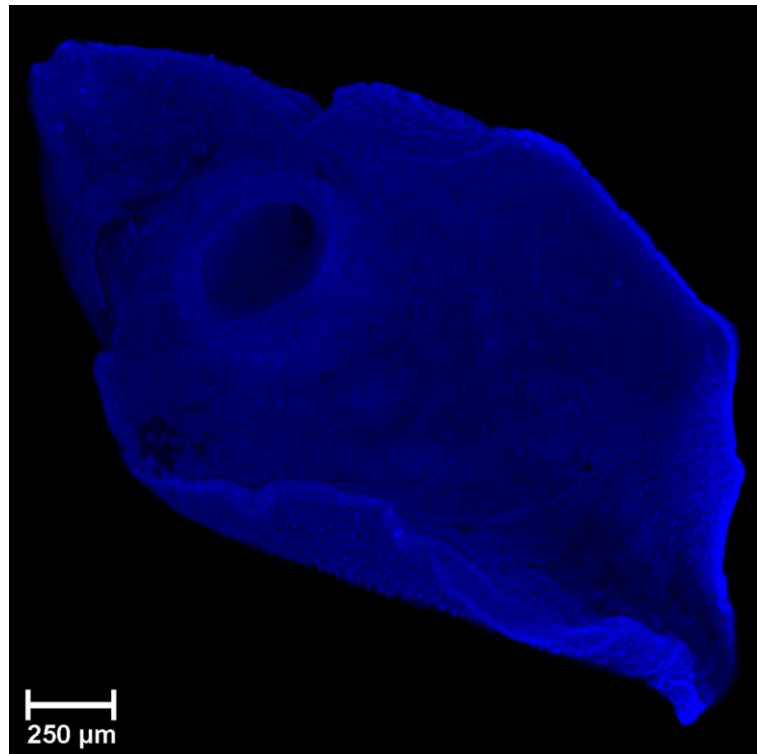


Figure 1. Adult *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* unstained sample autofluorescence corresponding to different excitation wavelengths (single stack).

In line with previous studies [19,20,48,53-55] our obtained results confirm the arrangement of somatic musculature for adult *P. fasciolaemorpha*. Three main muscle layers were obtained: an outer circular layer, intermediate longitudinal and diagonal layer. Images of Z-series are shown in Figures 2–4.

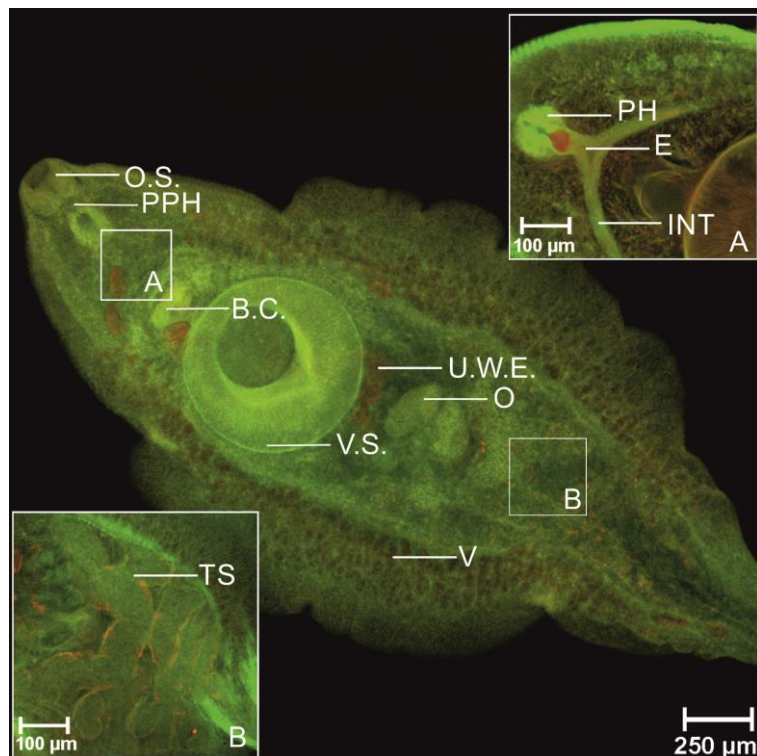


Figure 2. Adult *Parafasciolopsis faciolaemorpha* stained with AZPP dye, fixative AFA (single stack). O.S.—oral sucker, PPH—prepharynx, PH—pharynx, E—esophagus, C—cirrus, V—vitellaria, TS—testes, O—ovary, INT—intestine, V.S.—ventral sucker, U.W.E.—uterus filled with eggs.

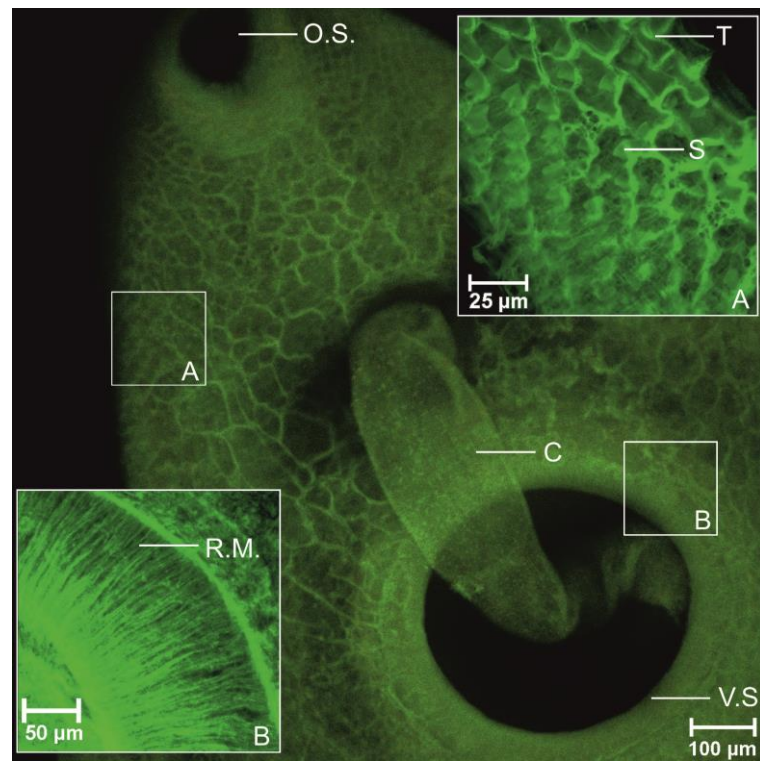


Figure 3. Adult *Parafasciolopsis faciolaemorpha* stained with AZPP dye, ethanol 70% (single stack). O.S.—oral sucker, V.S.—ventral sucker, C—cirrus, T—tegument, S—spikes, R.M.—radial muscle fibers.

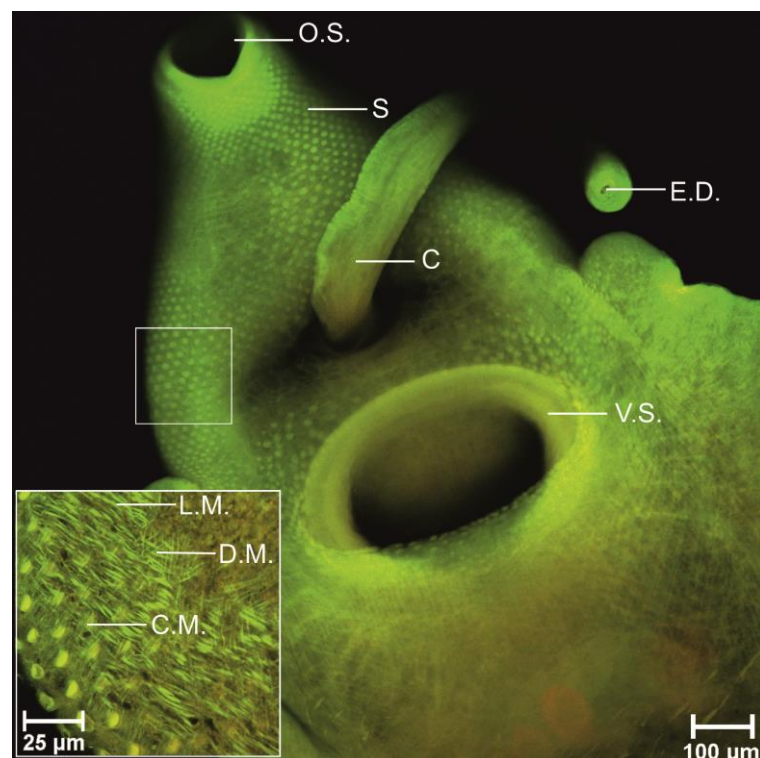


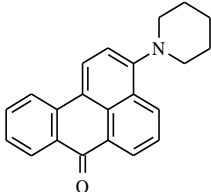
Figure 4. Adult *Parafasciolopsis faciolaemorpha* stained with AZPP dye, fixative 70% ethanol (single stack). O.S.—oral sucker, V.S.—ventral sucker, S—spikes, C—cirrus, E.D.—ejaculatory duct, L.M—longitudinal muscle fibers, D.M.—diagonal muscle fibers, C.M.—circular muscle fibers.

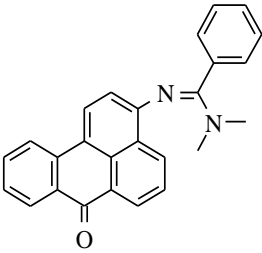
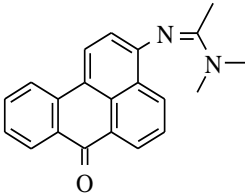
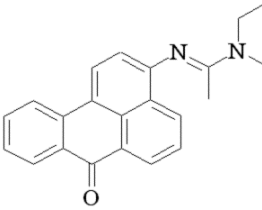
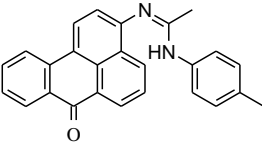
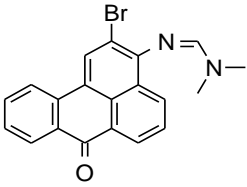
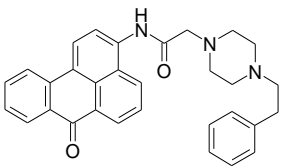
Muscle layers are shown in green. The outer circular layer was organized in flat strips that run parallel to each other; also, the intermediate longitudinal muscle layer was organized in thicker strips than circular muscle fibers. As per below, the circular and longitudinal muscles diagonal muscle fibers organized in bundles were visualized. Diagonal muscles crisscross each other.

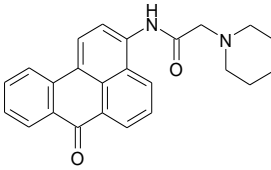
We have verified that using our synthesized benzanthrone dyes and developed staining protocol produces similar results to results obtained using fluorescein isothiocyanate or tetramethylrhodamine B isothiocyanate-conjugated phalloidin staining for actin [48]. When comparing our results to those of Kumar et al. [47] study, it shall be pointed out that we detected muscle cell bodies connected to muscle fibers in the diagonal muscle layer. However, we did not observe cell bodies in longitudinal or circular muscles. The musculature of adhesive organs, such as suckers, is mostly very complex, including several muscle types derived from body-wall [20]. Our results showed that both suckers consist of circular, longitudinal and radial muscle layers. A similar conclusion was reached by Terenina et al. [48]. Halton and Maule [50] have demonstrated that the reproductive system and part of the digestive system organs consist mostly of circular muscle fibers, including several longitudinal muscle fibers. After a detailed examination of confocal images, we concluded that we obtained the same results. We also noted that circular muscle fibers are more densely located within cirrus and cirrus sac-like *Fasciola hepatica* [46]. Overall morphology was generally similar reported by Skrjabin [56]. Glycogen reserves were detected in the entire parenchyma below the tegument, however, more in the vitellaria area. Scattered deposits of glycogen were observed in the attachment apparatus. As eggs mostly consist of glycogen and lipids, they have bright fluorescence. Furthermore, glycogen reserves and lipids serve as an energy source, a regulator for cellular activities and building materials for biological membranes [57].

Previous research of parasites was conducted using luminescent dyes of three groups-aminobenzanthrone (P8), amidinobenzanthrones (AM1, AM2, AM4, AM16 and AM323) and aminoamidobenzanthrones (AZP5 and 3-N-(2-piperidinylacetamido) benzanthrone) for various Trematoda species staining. Based on previous study results, only amidinobenzanthrone (AM323) and aminoamidobenzanthrone (AZPP) were used to optimize fixation technique and staining protocol (see Table 5).

Table 5. Trematoda staining with dyes from different luminophore groups.

Fluorescent Dye	Chemical Fixator Used	Structure	Object and Description on Stained Systems	References
P8	AFA solution		<i>Prosotocus confusus</i> adults overall view: spikes, oral and ventral suckers; digestive system: prepharynx, pharynx, esophagus, intestine; reproductive system: uterus with eggs, cirrus	[3]
AM1			<i>Prosotocus confusus</i> adults	[3]

	AFA solution		overall view: spikes, oral and ventral suckers; integumentary system: radial and longitudinal muscle fibers; digestive system: prepharynx, pharynx, esophagus, intestine, excretory bladder, excretory pore; reproductive system: ovary, testis, vitellaria, uterus with eggs, cirrus <i>Diplostomum</i> sp.	
AM2	AFA solution		overall view: oral and ventral suckers, pseudo-suckers, holdfast, calcareous bodies; digestive system: pharynx, esophagus, intestine; primary excretory system (very bright) <i>Prosotocus confusus</i> adults	[3]
AM4	AFA solution		overall view: spikes, oral and ventral suckers; integumentary system: diagonal and longitudinal muscle fibers in poor quality; digestive system: prepharynx, pharynx, esophagus, intestine; reproductive system: ovary, testis, vitellaria, cirrus, eggs <i>Diplostomum</i> sp.	[3]
AM16	AFA solution		overall view: oral and ventral suckers, pseudo-suckers (very bright), holdfast; digestive system: pharynx, esophagus, intestine; primary excretory system (very bright) <i>Parafasciolopsis fasciolae-morpha</i> adults	[3]
AM323	AFA solution		overall view: spikes, oral and ventral suckers; integumentary system: three muscle layers and radial muscles of suckers in poor quality; digestive system: prepharynx, pharynx, esophagus, intestine, reproductive system: testis, eggs, cirrus <i>Parafasciolopsis fasciolae-morpha</i> adults	Current study
AZP5	AFA solution		overall view: spikes, oral and ventral suckers; integumentary system:	[55]

			tegument not in details, three muscle layers and radial muscles of suckers; digestive system: prepharynx, pharynx, esophagus, intestine, re- productive system: testis, eggs, cirrus
			<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i>
			overall view: spikes, oral and ventral suckers in de- tail, the dimensional structure of the whole body; integumentary sys- tem: tegument (in details) connected with spikes, three muscle layers and radial muscles of suckers in details and very bright;
AZPP	AFA solution		digestive system: prepharynx, pharynx, esophagus, intestine, re- productive system: ovary, testis, vitellaria, uterus with eggs, cirrus and its canal
			Current study

Overall view, spikes, oral and ventral suckers of parasites were clearly visualized in all three dye groups. In addition, using protocol with AZPP dye, the dimensional structure of the whole body was clearly visualized. The staining protocol using P8 dye was not suitable for integumentary system visualization. Using dye of amidobenzanthrones group made it to some extent observe the integumentary system, yet images were either not detailed or in pore quality. Compared to dyes mentioned above, usage of aminoamidobenzanthrones group dyes made it possible better visualization of tegument in detail, connected with spikes and all three muscle-fiber types: circular, diagonal and longitudinal. Usage of various dye groups did not affect visualization of Trematoda's digestive system. Imaging of the reproductive system of adult *P. fasciolaemorpha* was clearer and detailed using AZPP luminophore dye. Opposite amidinobenzanthrones AM1 and AM4 using for *P. confusus* staining show detailed visualization of the reproductive system, and vitellaria was clearly visible.

In contrast to earlier findings, we confirmed that the developed method using synthesized AZPP dye is applicable for *P. fasciolaemorpha* examination, make staining protocols less time-consuming, and save resources.

5. Conclusions

Our findings in mutual comparison demonstrate the use of the AZPP luminophore and ethanol 70% or AFA solution as fixatives are a more suitable tool for studies of organic substances—carbohydrates, lipids, and proteins, moreover, for anatomical and muscular arrangement of trematodes than AM323. Our work has led us to the conclusion that specimens fixed in 70% ethanol required an additional 1 to 2 min for sample wash out with xylene compared to specimens fixed in AFA solution. This paper has highlighted that AZPP and 70% ethanol combination is more suitable for external surface and muscle layer examination and AZPP and AFA combination for internal structure assessment. Taken

together, the findings suggest that Bouin's solution is not suitable for *P. fasciolaemorpha* fixation in cases when samples will be used for examination by confocal microscopy.

For further studies, we should investigate the musculature arrangement of the attachment organs of adult *P. fasciolaemorpha*. Our investigations into this area are still ongoing.

Author Contributions: Conceptualization, E.K. and M.K.; methodology, E.K., M.K., I.R., L.M.; formal analysis, I.R. and M.K.; writing—original draft preparation, I.R.; writing—review and editing, M.K., J.K. and I.G.; visualization, L.M. and I.R.; supervision, I.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Kirilova, E.M.; Kalnina, I.; Kirilov, G.K.; Meirovics, I. Spectroscopic study of benzanthrone 3-N-derivatives as new hydrophobic fluorescent probes for biomolecules. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 645–648, doi:10.1007/s10895-008-0340-3.
- Zhytniakivska, O.; Trusova, V.; Gorbenko, G.; Kirilova, E.; Kalnina, I.; Kirilov, G.; Kinnunen, P. Newly synthesized benzanthrone derivatives as prospective fluorescent membrane probes. *J. Lumin.* **2014**, *146*, 307–313, doi:10.1016/j.jlumin.2013.10.015.
- Kirilova, E.; Kecko, S.; Mežaraupė, L.; Gavarāne, I.; Pučkina, A.; Mickeviča, I.; Rubeniņa, I.; Osipovs, S.; Bulanovs, A.; Pupiņš, M.; et al. Novel luminescent dyes for confocal laser scanning microscopy used in Trematoda parasite diagnostics. *Acta Biochim. Pol.* **2018**, *65*, 449–454, doi:10.18388/abp.2018_2574.
- Kirilova, E.; Mickevica, I.; Mezaraupė, L.; Puckins, A.; Rubenina, I.; Osipovs, S.; Kokina, I.; Bulanovs, A.; Kirjusina, M.; Gavarane, I. Novel dye for detection of callus embryo by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Luminescence* **2019**, *34*, 353–359, doi:10.1002/bio.3616.
- Ulucan, A.; Yuksel, H.; Dortbudak, B.; Yakut, S. Comparative Examination of Commonly Used Some Fixatives with Routine Histochemical Staining's for The Optimal Histological Appearance in The Gill Tissue of Zebrafish. *Kocatepe Vet. J.* **2019**, *12*, 158–167, doi:10.30607/kvj.526779.
- Moelans, C.; Ter Hoeve, N.; van Ginkel, J.W.; Ten Kate, F.J.; van Diest, P.J. Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* **2011**, *136*, 548–556, doi:10.1309/AJCPHH1B0COCBGOM.
- Camacho, S.; Ostos-Garrido, M.V.; Domezain, A.; Carmona, R. Study of the olfactory epithelium in the developing sturgeon. Characterization of the crypt cells. *Chem. Senses* **2010**, *35*, 147–156.
- Doldan, M.; Cid, P.; Mantilla, L.; de Miguel Villegas, E. Development of the olfactory system in turbot (*Psetta maxima* L.). *J. Chem. Neuroanat.* **2011**, *41*, 148–157.
- Bancroft, J.D.; Gamble, M. Theory and practice of histology techniques. In *Fixation of Tissues*, 8th ed.; Editor Layton, C., Bancroft, J.D., Suvarna, S.K., Eds.; Churchill Livingstone Elsevier: London, England, 2019; pp. 40–63.
- Devitsina, L.V.; Radishcheva, O.L. Development of the olfactory organ during early ontogeny of threespine stickleback. *J. Ichthyol.* **1989**, *29*, 42–48.
- Ahmed, H.G.; Mohammed, A.; Hussein, M. A comparison study of histochemical staining of various tissues after Carnoy's and formalin fixation. *Sudan J. Med. Sci.* **2011**, *5*, 84–87, doi:10.4314/sjms.v5i4.64497.
- Pereira, M.A.; Dias, A.R.; Faraj, S.F.; Cirqueira, C.D.S.; Tomitao, M.T.; Carlos, N.S.; Ribeiro, J.R.U.; De Mello, E.S. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. *Histopathology* **2014**, *66*, 388–397, doi:10.1111/his.12532.
- Roberts, R.J.; Smail, D.A.; Munro, E.S. Laboratory methods. In *Fish Pathology*, 4th ed.; R.J., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2012; pp. 439–480.
- Weber, E.P.S.; Govett, P. Parasitology and necropsy of fish. *Compendium (Yardley PA)* **2009**, *31*, E12.
- Wali, A.; Balkhi, M.H.; Maqbool, R.; Darzi, M.M.; Shah, F.A.; Bhat, F.A.; Bhat, B.A. Distribution of Helminth Parasites in Intestines and Their Seasonal Rate of Infestation in Three Freshwater Fishes of Kashmir. *J. Parasitol. Res.* **2016**, *2016*, 8901518, doi:10.1155/2016/8901518.
- Campiã, K.M.; Ribas, A.C.A.; Silva, I.C.O.; Dalazen, G.T.; Tavares, L.E.R. Anuran helminth communities from contrasting nature reserve and pasture sites in the Pantanal wetland, Brazil. *J. Helminthol.* **2017**, *1*, 1–6, doi:10.1017/S0022149X16000109.
- Casselbrant, A.; Helander, H.F. Effects of fixation on electrophysiology and structure of human jejunal villi. *Microsc. Res. Tech.* **2018**, *81*, 376–383.


18. Paddock, S.W. Confocal Laser Scanning Microscopy. *BioTechniques* **1999**, *27*, 992–1004.
19. Krupenko, D.Y. Muscle system of *Diplodiscus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous, and ovigerous adults. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 941–952, doi:10.1007/s00436-013-3726-3.
20. Krupenko, D.Y. Oral sucker in Digenea: Structure and muscular arrangement. *Zoomorphology* **2019**, *138*, 29–37, doi:10.1007/s00435-018-0423-x.
21. Machado-Silva, J.R.; Neves, R.H.; Gomes, D.C. *Schistosoma mansoni* specimens first described by Pirajá da Silva in Brazil (1908) re-examined by confocal laser scanning microscopy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2011**, *44*, 331–333.
22. Dapson, R.W. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. *Biotech. Histochem.* **2007**, *82*, 173–187, doi:10.1080/10520290701704188.
23. Fakhar, M.; Ghobaditara, M. Phenazopyridine as an innovative stain for permanent staining of trematodes. *Trop. Parasitol.* **2016**, *6*, 86–88, doi:10.4103/2229-5070.175127.
24. Gower, W.C. A Modified Stain and Procedure for Trematodes. *Stain. Technol.* **1939**, *14*, 31–32, doi:10.3109/10520293909110291.
25. Drózd, J. Materials contributing to the knowledge of the helminth fauna of Cervus (*Russa unicolor* Kerr and *Muntjac muntjac* Zimm of Vietnam, including two new nematode species: *Oesophagostomum labiatum* sp. n. and *Trichocephalus muntjaci* sp. n. *Acta Parasitol. Polon.* **1973**, *21*, 465–474.
26. Rikowski, A.S. On the mutual exchange of helminths between the elk and domestic sheep (with reference to *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1955**, *104*, 335–336.
27. Lachowicz, J. Experimental infection with *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* in sheep. *Polska Akademia Nauk, Warszawa* (Poland). *Inst. Parazytol.* **1987**, *43*, 461–465, doi:10.2478/jvetres-2019-0068.
28. Filip-Hutsch, K.; Hutsch, T.; Kolasa, S.; Demiaszkiewicz, A.W. First Description of Histopathological Lesions associated with a Fatal Infection of Moose (*Alces Alces*) with the Liver Fluke *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* Ejsmont, 1932. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 549–554, doi:10.2478/jvetres-2019-0068.
29. Filip, K.J.; Pyziel, A.M.; Demiaszkiewicz, A.W. A massive invasion of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* in elk (*Alces alces*) in Lublin Province, Poland. *Ann. Parasitol.* **2016**, *62*, 107–110, doi:10.17420/ap6202.40.
30. Polaz, S.; Anisimova, A.; Labanouskaya, P.; Viarbitskaya, A.; Kudzelic, V. The role of wild and domestic ungulates in forming the helminth fauna of *European bison* in Belarus. *Eur. Bison Conserv. Newsl.* **2017**, *10*, 79–86.
31. Bergmane, B.; Keidāne, D.; Krūklīte, A.; Berziņa, D. Invasion of *Parafasciolopsis* in elks in Latvia. In Proceedings of the Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna. Konferenču “Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes” RAKSTI, Jelgava, Latvia, 24 November 2017.
32. Bergmane, B.; Bērziņa, D.; Visocka, A. Histopathological changes in liver of elks with *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* invasion. *Res. Rural. Dev.* **2019**, *1*, 262–264.
33. Samojlovskaia, N.A. The comparative analysis of parasitofauna of spotty deers and lambs in national park “Losinyj island”. *Russ. J. Parasitol.* **2008**, *4*, 13–15. (In Russian, with English summary)
34. Filip, K.J.; Demiaszkiewicz, A.W. Internal parasitic fauna of elk (*Alces alces*) in Poland. *Acta Parasitol.* **2016**, *61*, 657–664, doi:10.1515/ap-2016-0092.
35. Majoras, G.; Erdélyi, K.; Sztojokov, V.A. *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea) metely elofordulasa Magyarorszagon (Translated title of the contribution: Occurrence of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea) in Hungary). *Magy. Allatorv. Lapja* **2000**, *122*, 469–474.
36. Maslennikova, O.V.; Panova, S.V. Morphological characteristics of trematodes *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Ejsmont, 1932). *Int. J. Exp. Educ.* **2015**, *8*, 82–83. (In Russian, with English summary)
37. Gulakov, A.V.; Penkevich, V.A. *Parafasciolopsis* and distributions of ¹³⁷Cs by the bodies and tissues of organs and tissue of elk and roe deer living in the territory of the Polesian radiation-ecological reserve. *Bulletin of MSPU named after I. P. Shamyakin* **2020**, *55*, 30–36.
38. Eckert, J.; Friedhoff, K.T.; Zahner, H.; Deplazes, P. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH&Co.: Stuttgart, Germany, 2005; pp. 150–165.
39. Chikhlyayev, I.V.; Kirillova, N.Y.; Kirillov, A.A. Ecological analysis of trematodes (Trematoda) of march frog *Pelophylax ridibundus* (Ranidae, Anura) from various habitats of the national park “Samarskaya luka” (Russia). *J. Nat. Conserv.* **2018**, *3* (Suppl. 1), 36–50, doi:10.24189/ncr.2018.039.
40. Kirilova, E.; Yanichev, A.; Puckins, A.; Fleisher, M.; Belyakov, S. Experimental and Theoretical Study on Structure and Spectroscopic Properties of 2-Bromo-3-N-(N',N'-dimethylformamidino) benzanthrone. *Luminescence* **2018**, *33*, 1217–1225, doi:10.1016/j.saa.2018.05.029.
41. Kirilova, E.M.; Nikolaeva, I.D.; Romanovska, E.; Puckins, A.I.; Belyakov, S.V. The synthesis of novel heterocyclic 3-acetamide derivatives of benzanthrone. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2020**, *56*, 192–198, doi:10.1007/s10593-020-02644-1.
42. Kapusta, P.; Machalický, O.; Hrdina, R.; Nepraš, M.; Zimmt, M.B.; Fidler, V. Photophysics of 3-substituted benzanthrone: Substituent and solvent control of intersystem crossing. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 9740–9746.
43. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: New York, NY, USA, 2001.
44. Gonta, S.; Utinans, M.; Kirilov, G.; Belyakov, S.; Ivanova, I.; Fleisher, M.; Savenkov, V.; Kirilova, E. Fluorescent substituted amidines of benzanthrone: Synthesis, spectroscopy and quantum chemical calculations. *Spectrochim. Acta Part A* **2013**, *101*, 325–334, doi:10.1016/j.saa.2012.09.104.

45. Kirilova, E.M.; Puckins, A.I.; Romanovska, E.; Fleisher, M.; Belyakov, S.V. Novel amidine derivatives of benzanthrone: Effect of bromine atom on the spectral parameters. *Spectrochim. Acta A* **2018**, *202*, 41–49, doi:10.1016/j.saa.2018.05.029.
46. Mair, G.R.; Maule, A.G.; Shaw, C.; Johnston, D.F.; Halton, D.W. Gross anatomy of the muscle systems of *Fasciola hepatica* as visualized by phalloidin-fluorescence and confocal microscopy. *Parasitology* **1998**, *117*, 75–82.
47. Kumar, D.; Mcgeown, J.G.; Reynoso-Ducoing, O.; Ambrosio, J.R.; Fairweather, I. Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **2003**, *127*, 457–473, doi:10.1017/S0031182003003925.
48. Terenina, N.B.; Kreshchenko, N.D.; Mochalova, N.V.; Nefedova, D.; Voropaeva, E.L.; Movsesyan, S.O.; Demiaszkiewicz, A.; Yashin, V.A.; Kuchin, A.V. The New Data on the Serotonin and FMRFamide Localization in the Nervous System of *Opisthorchis felineus* Metacercaria. *Acta Parasitol.* **2020**, doi:10.2478/s11686-019-00165-2.
49. Gavarane, I.; Kirilova, E.; Rubeniņa, I.; Mežaraupe, L.; Osipovs, S.; Dekšne, G.; Pučkina, A.; Kokina, I.; Bulanovs, A.; Kirjušina, M. A Simple and Rapid Staining Technique for Sex Determination of Trichinella Larvae Parasites by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microsc. Microanal.* **2019**, 1–7, doi:10.1017/S1431927619015046.
50. Halton, D.W.; Maule, A.G. Flatworm nerve-muscle: Structural and functional analysis. *Can. J. Zool.* **2004**, *82*, 316–333, doi:10.1139/z03-221.
51. Tyler, S.; Hooge, M. Comparative morphology of the body wall in flatworms (Platyhelminthes). *Can. J. Zool.* **2004**, *82*, 194–210, doi:10.1139/Z03-222.
52. Sednev, M.V.; Belov, V.N.; Hell, S.W. Fluorescent Dyes with Large Stokes Shifts for Super-Resolution Optical Microscopy of Biological Objects: A Review. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 042004, doi:10.1088/2050-6120/3/4/042004.
53. Krupenko, D.; Dobrovolskij, A.A. Morphological framework for attachment and locomotion in several Digenea of the families Microphallidae and Heterophyidae. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 3799–3807, doi:10.1007/s00436-018-6085-2.
54. Krupenko, D.Y.; Dobrovolskij, A.A. Somatic musculature in trematode hermaphroditic generation. *BMC Evol. Biol.* **2015**, *15*, 189, doi:10.1186/s12862-015-0468-0.
55. Kirjusina, M.; Gavarane, I.; Mežaraupe, L.; Kecko, S.; Kirilova, E. Application of novel synthesized luminophore AZP5 for efficient staining of Trematoda: Fasciolidae parasites. *Int. Multidiscip. Sci. GeoConference SGEM* **2018**, *18*, 27–34, doi:10.5593/sgem2018/6.2/S25.004.
56. Skrjabin, K.I. Trematodes of animals and human. In *Basic Trematodology. Vol III*; Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow-Leningrad, Russia, 1949; pp. 63–66.
57. Świdorski, Z.; Kacem, H.; Mackiewicz, J.S.; Miquel, J. Functional ultrastructure and cytochemistry of vitellogenesis and mature vitellocytes of the digenean *Cainocreadium labracis* (Dujardin, 1845), parasite of *Dicentrarchus labrax* (L., 1758). *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 493–504, doi:10.1007/s00436-018-6180-4.

II

Original Article

A Simple and Rapid Staining Technique for Sex Determination of *Trichinella* Larvae Parasites by Confocal Laser Scanning Microscopy

Inese Gavarane^{1*} , Elena Kirilova¹, Ilze Rubeniņa¹, Ligita Mežaraupe¹, Sergejs Osipovs¹, Gunita Deksnē^{2,3}, Aleksandrs Pučkins¹, Inese Kokina¹, Andrejs Bulanovs¹ and Muza Kirjušina¹

¹Institute of Life Sciences and Technology, Daugavpils University, Daugavpils LV-5401, Latvia; ²Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR, Riga LV-1076, Latvia and ³Faculty of Biology, University of Latvia, Riga LV-1004, Latvia

Abstract

The roundworms of *Trichinella* genus are worldwide distributed and their prevalence in nature is high. *Trichinella* genus parasites are the causative agents of foodborne zoonosis trichinellosis. The main prevention and control of the infection are meat inspection by the magnetic stirrer method for the detection of *Trichinella* larvae in muscle samples. The treatment can be effective if the parasite is discovered early in the intestinal phase. Once the *Trichinella* larva has reached the muscle tissue, the parasite remains therein and there is no treatment for this life cycle stage. The *Trichinella* species is dioecious with separate male and female individuals. The developed staining technique that uses confocal laser scanning microscopy (CLSM) displays sufficient results for *Trichinella* larvae examination and this protocol is applicable to study the internal and external structures and for the sex determination of *T. britovi* and *T. spiralis* larvae samples. In the present study, a luminescent derivative was synthesized and used for staining of *T. spiralis* and *T. britovi* larvae samples for the examination by CLSM. Various fixatives, such as AFA, 70% ethanol, and Bouin's and Carnoy's solutions were tested for sample preparation. The synthesized luminescent compound demonstrates best visualization results for samples fixed in Bouin's fixative.

Key words: benzanthrone dye, Bouin's fixative, confocal laser scanning microscopy, fixatives, *Trichinella* larvae sex determination

(Received 14 August 2019; revised 1 October 2019; accepted 14 October 2019)

Introduction

Parasitic roundworms of the genus *Trichinella* of the phylum Nematoda are present in all continents, except Antarctica (Pozio & Murrell, 2006; Pozio, 2007). *Trichinella* are parasites of carnivorous and omnivorous animals, which can be transmitted to humans by the consumption of uncooked meat and meat products of different animal origin (La Rosa et al., 2012). *Trichinella* spp. are the causative agent of the human trichinellosis, which can be fatal depending on the infective dose (Andy et al., 1977). Overall, nine species and three genotypes of *Trichinella* are recognized (Pozio et al., 2009a, 2009b). Currently, the differentiation of *Trichinella* larvae species is mainly based on molecular diagnostic methods due to no known morphological keys for species differentiation (Gozdzik et al., 2017).

In most outbreaks of *Trichinella* infection domestic life cycle *T. spiralis* was found, and the main host is a domestic pig. Sylvatic *Trichinella* species, such as *T. britovi* and *T. nativa*, are often associated with game meat such as wild boars and bears (Murrell, 2016). Latvia is one of the countries with a high prevalence of *Trichinella* infection in wildlife (Kirjušina et al., 2015; Deksnē et al., 2016) and *Trichinella* larvae was also found in nonspecific

hosts such as European beaver (Segliņa et al., 2015). *T. spiralis* was recently ranked third and *Trichinella* other than *T. spiralis* species ranked six among zoonotic parasites evaluated for their European relevance as foodborne pathogens (Bouwknegt et al., 2018).

Trichinella species are dioecious with separate male and female individuals and they are the most numerous species of nematodes that present sexual dimorphism (Ancell & Pires-daSilva, 2017). They are characterized by a different reproductive system, nervous system, body size (Yeates & Boag, 2003, 2006), pheromone release (Bone & Shorey, 1978), and different life expectancy (McCulloch & Gems, 2003). Mature *Trichinella* females are larger in body length and width than adult males (Bughdadi, 2010). Previously, the sex determination of *T. spiralis* was mainly based on karyotyping (Mutafova et al., 1982), gonad position, number of stichocytes (Villella, 1966), and rectum length (Kozek, 1975; Liu et al., 1991).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) is an important tool for the visualization of cellular structures (Amos et al., 1987; Transidico et al., 2004). Luminescent dyes are often added to cellular systems to improve imaging. As a result, CLSM requires the development of new efficient and specific fluorophores to visualize structures of interest. Among various luminescent dyes, benzanthrone derivatives are recognized as prospective fluorescent probes for characterizing lipids and proteins (Zhytniakivska et al., 2014; Ryzhova et al., 2016). Some benzanthrone dyes were used to monitor structural changes in membranes and for nucleic acid binding studies (Dobretsov,

*Author for correspondence: Inese Gavarane, E-mail: inese.gavarane@du.lv

Cite this article: Gavarane I et al (2019) A Simple and Rapid Staining Technique for Sex Determination of *Trichinella* Larvae Parasites by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microsc Microanal.* doi:10.1017/S1431927619015046

1989; Yang et al., 1999). Nowadays, CLSM is widely used to study parasites. In this regard, the development of new imaging protocols is an important task. The aim of the present study was to develop a staining technique using the synthesized benzantrone luminescent dye for microscopic examination and sex determination of *T. britovi* and *T. spiralis* larvae by CLSM. In previous studies, by Kirilova et al. (2018a), fluorescent benzantrone dyes 3-*N*-(*N*',*N*'-dimethylbenzamidino)benzantrone, 3-*N*-(*N*',*N*'-dimethylacetamidino)benzantrone, 3-*N*-[*N*'-(4-methylphenyl)acetamidino]benzantrone, and (3-*N*-piperidinobenzantrone) with fixatives AFA and ethanol were applied for the visualization of surface morphological features and organ systems of various species of adult and larvae of trematodes from aquatic animals and showed good staining properties for digestive and reproductive system imaging. In the present study, the synthesized dye with an amide group which is more suitable for the examination of *Trichinella* larvae was found.

Materials and Methods

General

All reagents were of analytical grade (Sigma-Aldrich, USA) and were used as received. The progress of the chemical reactions and the purity of products were monitored by thin-layer chromatography on silica gel plates Merck Silica Gel F254 using the solvent system benzene/acetonitrile (3:1) as eluent. Column chromatography on silica gel was carried out on Merck Kieselgel (230–240 mesh) with benzene as an eluent. Melting points were measured on a Kofler apparatus and were left intact.

Infrared (IR) spectra were recorded on a Shimadzu Prestige-21FT spectrometer in KBr pellets. ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded on a Varian Mercury-400 instrument in CDCl₃ at 25°C using the residual chloroform signals as the internal standard at an ambient temperature.

Spectroscopic Measurements

Spectral parameters were measured in seven organic solvents with concentrations 10⁻⁵ M at an ambient temperature in 10 mm quartz cuvettes. All solvents were of p.a. or analytical grade. The absorption spectra were obtained using a UV–visible spectrophotometer Specord® 80 (Analytik Jena AG, Germany). The fluorescence emission spectra were recorded on an FLSP920 (Edinburgh Instruments Ltd., Scotland) spectrofluorimeter using 3-methoxybenzantrone [*Q*₅ = 0.56 in acetone (Kapusta et al., 2003)] as the reference luminophore.

Synthesis of 3-*N*-[2-(4-morpholinyl)acetamido]benzantrone

The dye was obtained from 3-*N*-(2-chloroacetamido)benzantrone, which was prepared from 3-aminobenzantrone according to the literature procedure (Staneva & Betcheva, 2007). To the solution of 0.16 g (0.5 mmol) 3-*N*-(2-chloroacetamido)benzantrone in 50 mL of 1,4-dioxane, morpholine (0.05 mL) was added under stirring. The resulting mixture was stirred for 3 h, then was poured into 15 mL of water and extracted with dichloromethane (2 × 50 mL), washed with saturated NaCl water solution, and dried. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using chloroform as an eluent to give 0.15 g (81%) of deep yellow powder with m.p. 160°C.

IR, ν (KBr) cm⁻¹: 1,304 (C–N); 1,573 (C=C); 1,649 (C=O); 1,697 (C=O); 2,963, 2,877, 2,802 (C–H); 3,291 (N–H).

¹H NMR, (CDCl₃) δ , ppm (*J*, Hz): 2.74 (t, *J* = 4.3, 4H, NCH₂); 3.64 (s, 2H, OCCH₂N); 3.85 (t, *J* = 4.3, 4H, OCH₂), 7.48 (td, *J* = 7.6; 1.1, 1H); 7.68 (td, *J* = 7.6; 1.4, 1H); 7.78 (td, *J* = 7.8; 1.0, 1H); 8.14 (d, *J* = 8.3, 1H); 8.23 (d, *J* = 8.3, 1H); 8.36 (d, *J* = 8.3, 1H); 8.41 (dd, *J* = 7.8; 1.4, 1H); 8.44 (d, *J* = 8.3, 1H); 8.73 (dd, *J* = 7.4; 1.2, 1H); 10.11 (br. s, 1H, NH).

Trichinella spp. Larvae Staining and Microscopy

T. spiralis and *T. britovi* larvae samples were fixed in four different fixative solutions for 1 h: 70% ethanol, Carnoy's (absolute ethanol, chloroform, glacial acetic acid in 6:3:1 ratio), Bouin's (5% acetic acid, 9% formaldehyde, 0.9% picric acid in 1:4:15 ratio), and AFA [85% ethanol, formalin, glacial acetic acid (pH = 4.5) in 17:2:1 ratio]. They were then washed and stored in 70% ethanol at 4°C until use. An ethanol solution of the luminophore with a molar concentration of dye 10⁻⁵ M was used for staining of examined larvae. Additionally, the commercial dye 3-methoxybenzantrone was used for larvae staining by the developed protocol. Before the staining procedure, the object was placed in 80% lactic acid for 10 s to obtain transparency and to straighten the sample and then it was washed three times in 70% ethanol. Furthermore, the sample was placed in the dye for 5 min and washed in 70% ethanol. Specimens were mounted in Canada balsam and covered with a coverslip.

A high-speed multiphoton CLSM Eclipse Ti-E microscope system (Nikon, Japan) was used. CLSM images were processed with the NIS Elements Advanced Research 3.2 64-bit software (Nikon, Japan). The excitation wavelength used for microscopy was 488 nm with an FITC filter (500–550 nm) for the synthesized luminophore and 3-methoxybenzantrone. Autofluorescence of *Trichinella* spp. larvae was measured with excitation of 405 and 488 nm wavelengths and equal intensities were used to excite autofluorescence. The registration of the fluorescence signal was performed by an internal spectral detector. The start wavelength for registration was chosen to be 20 nm higher than the excitation wavelength until the edge of red visible spectra. In the optical path, we did not use any passive cut filters. Images were acquired as *Z* stacks with a 0.9 μ m *Z* step size.

Results and Discussion

Synthesis and Characterization

Currently, the synthesis of new high-emitting and low-toxic luminescent dyes (in particular, benzantrone derivatives) remains an important task for the search of new efficient probes and labels. Recently reported derivatives of 3-acetamidobenzantrone are highly luminescent compounds and used as sensors for various substances (Wang et al., 2004; Staneva & Betcheva, 2007; Staneva et al., 2019), examination of adult and larvae of trematodes from aquatic animals (Kirilova et al., 2018a), and visualization of callus embryo (Kirilova et al., 2019).

In this connection, we continue our research on the synthesis of new benzantrone luminescent substances, developing new derivatives of 3-aminobenzantrone with amide and substituted amine groups. A traditional synthetic method for *N*-substituted amines is the nucleophilic substitution reaction of the halogen atom with appropriate amines. The target synthesis was realized by the reaction of a previously prepared derivative (Staneva & Betcheva,

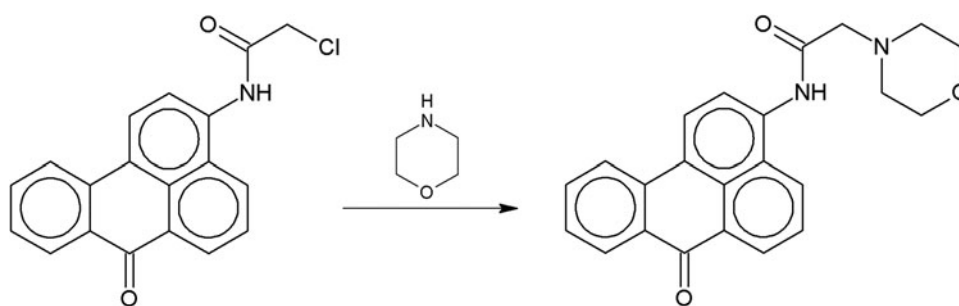


Fig. 1. Synthetic route of amine 3-*N*-[2-(4-morpholinyl)acetamido]benzanthrone.

2007) and morpholine in 1,4-dioxane as a solvent, obtaining novel heterocyclic amine 3-*N*-[2-(4-morpholinyl)acetamido]benzanthrone. This synthetic route is presented in Figure 1.

The synthesized dye is a crystalline deep yellow colored substance. The chemical structure of the prepared dye was confirmed by ^1H NMR spectroscopy: in the spectrum of the dye, the broad singlet signal of amide group proton at 10.11 ppm, the triplet signals at 2.74 and 3.85 ppm of the morpholine moiety, the singlet signal of the acetamide CH_2 group at 3.64 ppm, and the multiplet signal (from 7.48 to 8.73 ppm) of aromatic protons of the benzanthrone polycyclic system was found. In the infrared spectrum of the prepared compound, the characteristic vibration bands of carbonyl groups ($1,649$ and $1,697\text{ cm}^{-1}$) and the bands near $3,300\text{ cm}^{-1}$ from NH vibrations were detected.

Spectroscopy

Absorption and emission spectra of prepared dye have been registered in seven various organic solvents with a wide range of polarities. For a fluorophore with prospective biological applications, it is important to study spectral parameters in water environments. Due to weak solubility of the examined dye, its spectral characteristics were recorded in a mixture of ethanol and water in a volumetric ratio of one to four. For this purpose, the ethanol solution of the luminophore was prepared and diluted with an appropriate amount of water resulting in a concentration of 10^{-5} M . The data of absorption and emission band maxima are presented in Table 1. In general trends, absorption spectra do not show considerable variations with solvents. The positions of absorption maxima are situated between 423 and 442 nm with an extinction coefficient from 4,640 to 6,750 (L/mol/cm).

The effect of polarity of the solvent on fluorescence maximum is more noticeable than that on the absorption spectrum: the fluorescence spectrum reveals positive solvatochromism when going from nonpolar benzene to the polar ethanol/water mixture—the bathochromic shift achieves 34 nm. This is typical spectral behavior for emitters with intramolecular charge transfer (ICT), which causes a large dipole moment in the excited state and emission parameters sensitive to the polarity of the surroundings (Sednev et al., 2015). Benzanthrone derivatives with an electron-accepting carbonyl group at 7-position and electron-withdrawing group at 3-position were compared with such ICT luminophores (Kapusta et al., 2003; Gonta et al., 2013; Kirilova et al., 2018b).

Studying the influence of solvent polarity on dye emission quantum yield, it was detected that solvents both with very low and high polarity, the fluorescence quantum yield is small (0.04–0.18). The largest emission yield (40–42%) is observed in chloroform and acetone solution.

Table 1. Absorption and fluorescence maxima of the dye 3-*N*-[2-(4-morpholinyl)acetamido]benzanthrone in various solvents (at concentration 10^{-5} M).

Solvent	Absorption		Fluorescence	
	λ_{abs} , nm	$\lg \epsilon$	λ_{em} , nm	Q
Benzene	442	3.68	537	0.18
Ethyl acetate	435	3.75	542	0.29
Chloroform	432	3.75	549	0.42
Acetone	438	3.77	552	0.40
N,N-Dimethylformamide	438	3.67	551	0.21
Dimethyl sulphoxide	433	3.78	547	0.27
Ethanol	426	3.83	565	0.09
Water:ethanol (4:1)	423	3.79	571	0.04

Trichinella Larvae Staining and Examination

In studies of *Trichinella* genus, CLSM mainly was used to examine various excretory and secretory antigens (Li et al., 1999), immune response (Bai et al., 2012), or interaction between *T. spiralis* and muscle cells *in vivo* (Bai et al., 2011) and was used for various experiments where the pathological and/or therapeutic effects were evaluated (Li et al., 1999; Masetti et al., 2004; Hao et al., 2014). However, a structure investigation by Murata et al. (1998) of *Trichinella* adults and larvae by CLSM showed stichocyte and their nuclear distribution and sizes.

In this work, we found that the synthesized benzanthrone luminophore is applicable for *T. spiralis* and *T. britovi* staining and demonstrated a more detailed structure of the worm than the commercial dye and other benzanthrone derivatives. The convenient fixative for the staining protocol using new the luminophore was Bouin's solution. The new staining technique was appropriate for fresh larvae samples obtained by the magnetic stirrer method. Additionally, this staining technique is simple and rapid in comparison with known protocols, which are time consuming and consist of several steps of sample preparation. Staining of one parasite by utilizing available protocols can take more than two days and the procedure is appropriate for staining of parasite-specific tissues (Stewart et al., 2003; Davila et al., 2010; Krupenko, 2014).

Almost all cells and tissues are able to fluoresce in the near ultraviolet of the visible spectrum. To study fluorescent markers, the fluorescent signal should be separated from the marker and the autofluorescence signal. The easiest way to do it is to choose the corresponding wavelength for excitation. Commonly, the

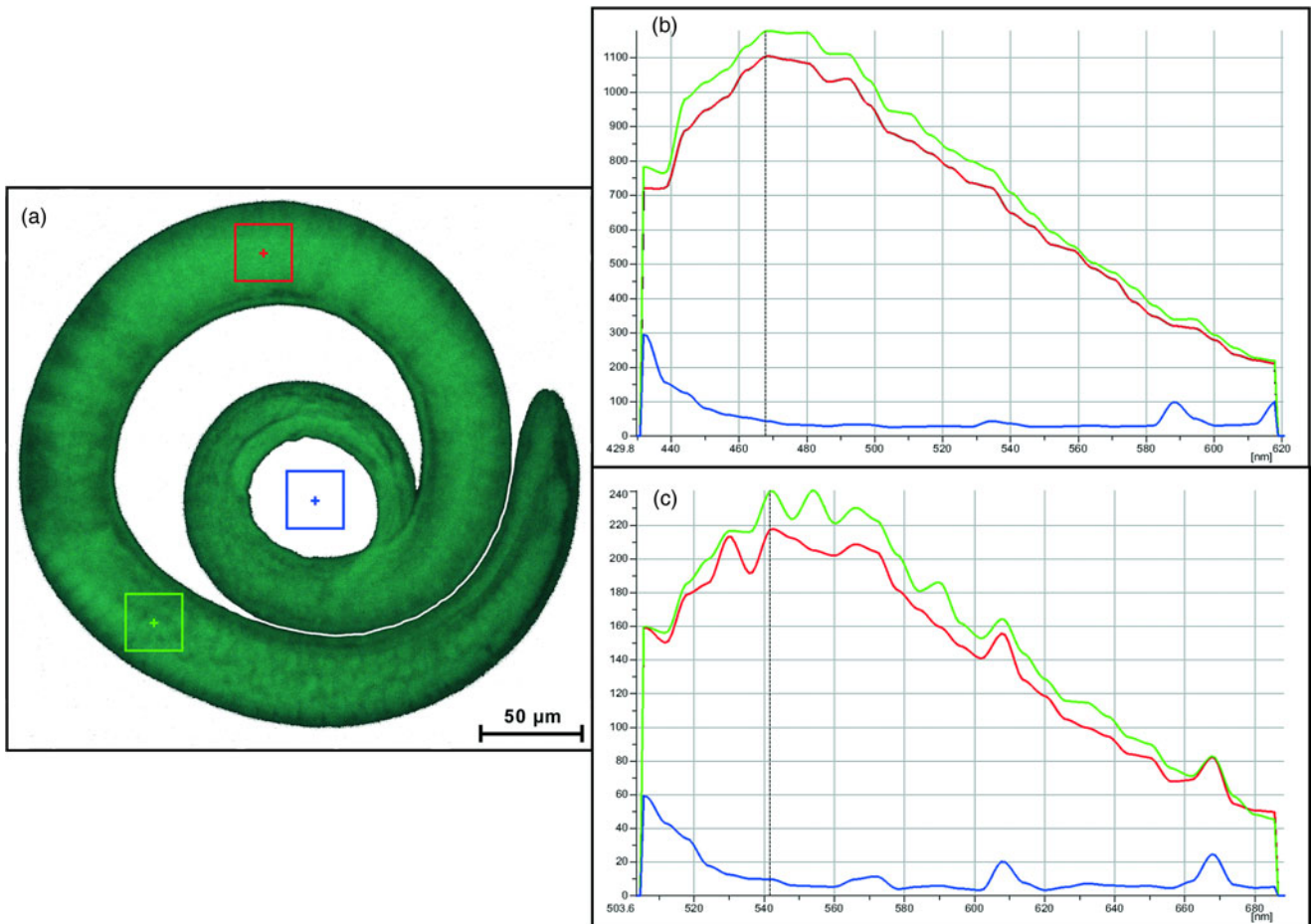


Fig. 2. Autofluorescence image of sample and autofluorescence charts corresponding to different excitation wavelengths. **(a)** Autofluorescence image of larva in Bouin's solution (405 nm excitation) shows the resulting autofluorescence spectra for three regions of interest (ROI) corresponding to different kinds of sample's tissue (red and green lines) and background (blue line), **(b)** autofluorescence emission spectrum corresponding to 405 nm excitation, and **(c)** autofluorescence emission spectrum corresponding to 488 nm excitation.

autofluorescence excitation region lies at about 400 nm and we chose the 488 nm excitation in order to dampen the autofluorescence signal in relation to the fluorescence signal from the marker (Schnell et al., 1999; Neumann & Gabel, 2002). Excitation with a certain wavelength gave more specific information about dyes and investigated samples. For example, excitation with 405 nm gave the best fluorescence and autofluorescence images for stained samples. Excitation by 488 nm gave us the best fluorescence/autofluorescence signal ratio. Samples of *Trichinella* larvae were prepared for experimental use during the investigation of the used fixatives. An experiment was carried out to evaluate the autofluorescence signal upon excitation with different wavelengths. The image of *Trichinella* larvae fixed in Bouin's solution (Fig. 2) shows the resulting autofluorescence spectra for three regions of interest (ROI). Experimental results show that using laser excitation of 488 nm, it is possible to achieve an almost 10-fold (depending on used fixatives) attenuation of the autofluorescence signal if we compare it with 405 nm wavelength excitation. Based on these data, it was decided to use a 488 nm laser in this study with an aim to maximally suppress unwanted autofluorescence signal. The selected wavelength is outside of the maximum of the absorption band of our markers using photomultiplier.

The parasite's body architecture, including insight into the body organ morphology and arrangement for both examined

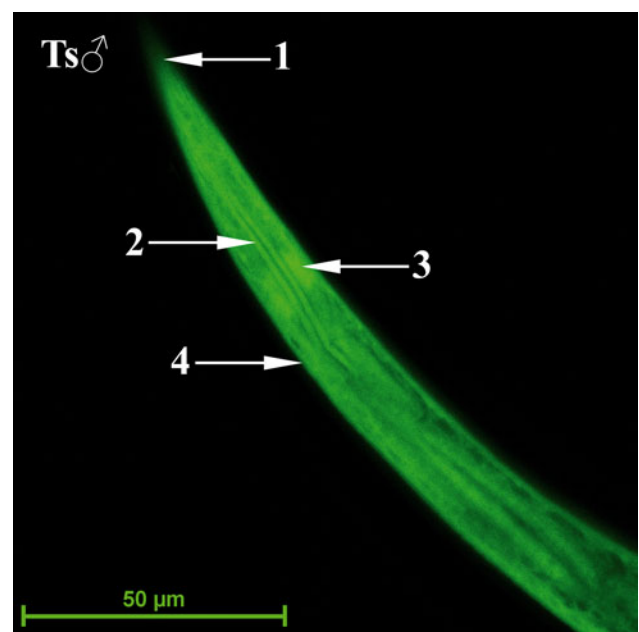


Fig. 3. CLSM image of *Trichinella* larva anterior end. Ts♂—*T. spiralis* male. 1—anterior end, 2—esophagus, 3—nerve ring, and 4—cuticle.

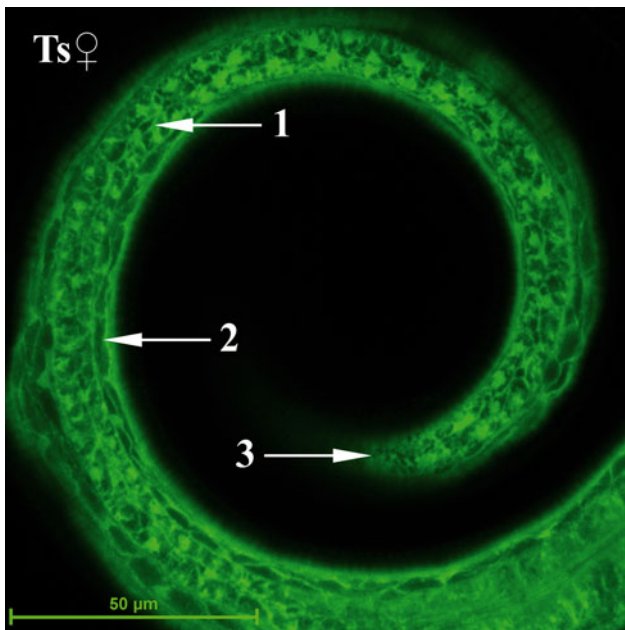


Fig. 4. CLSM image of *Trichinella* larva posterior end. Ts♀—*T. spiralis* female. 1—nervous system, 2—hypodermis, and 3—posterior end.

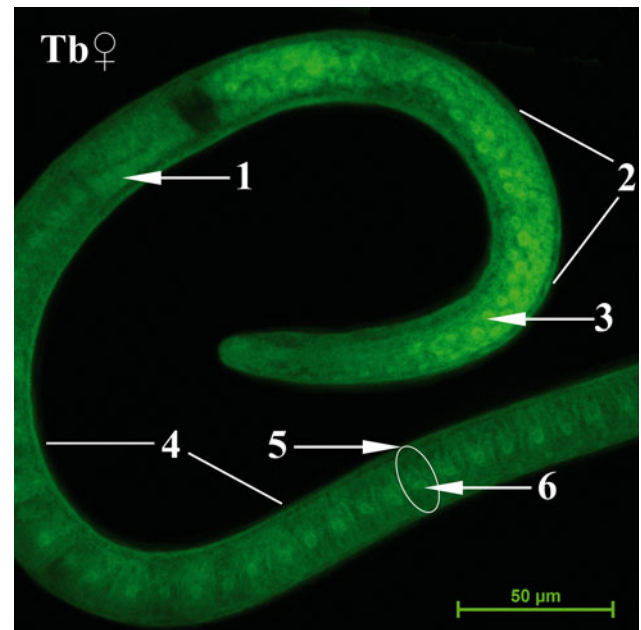


Fig. 5. CLSM image of *Trichinella* larva reproductive and digestive systems. Tb♀—*T. britovi* female. 1—midgut, 2—genital primordium, 3—primary oocyte, 4—stichosome, 5—stichocyte, and 6—nucleus of stichocyte.

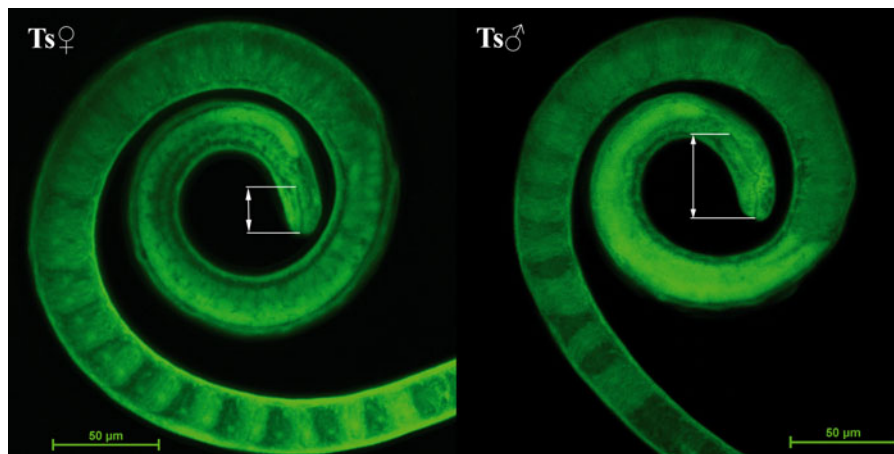


Fig. 6. CLSM image of *Trichinella* larva females and males rectum. Ts♀—*T. spiralis* female, Ts♂—*T. spiralis* male. With ↔ is marked rectum.

species, was visualized in detail. The body was as is typical for any nematode larvae with a blunt head and pointed tail. The posterior and anterior ends were distinguishable. The anterior end, esophagus, nerve ring, and cuticle are shown in Figure 3. The larvae have a cuticle with three or more outer layers which are made of collagen and other components. The outer layers are secreted by the epidermis or hypodermis and are noncellular (Lichtenfels et al., 1983). The results showed a high fluorescent signal in the larvae cuticle. Higher signal from a cuticle can be caused by lipid accumulation in the epicuticle of *Trichinella* larvae that is used as a source of energy for the survival of parasites in the host muscles (Gounaris et al., 1996). The posterior end, nervous system, and hypodermis are displayed in Figure 4. Hypodermis's bacillary bands were detected. The midgut, stichosome, stichocyte, and nucleus of the stichocyte of the digestive

system and the genital primordium and primary oocyte of the reproductive system are shown in detail in Figure 5. Additionally, the genital primordium including testis and uterine primordium in developing larvae were observed. The stichosome occupied the anterior half of the body cavity and it was observed almost in all samples. Furthermore, strong fluorescence was observed in stichocyte's nuclei.

The developed staining technique is appropriate for sex determination by measuring the rectum length of *Trichinella* larva (Figure 6). In the present study, the rectum length of the male *T. britovi* and *T. spiralis* was 41.08 ± 4.26 , 46.08 ± 2.95 μm SD and the female was 21.19 ± 2.45 SD, 20.55 ± 1.48 μm SD, respectively. Sex determination of *Trichinella* larvae is essential for the investigation of the parasite sex ratio in the host. The accumulation of knowledge and the development of techniques for sex

ratio manipulation of the parasite population could offer new opportunities for controlling reproductive strategies of parasites (Pires-daSilva, 2007). Additionally, the knowledge of the sex ratio is crucial for population studies. Usually, the parasite populations are fragmented in space and time and clumped transmission of sibling parasites is common for *Trichinella* genus.

Conclusions

The luminophore is applicable for *T. britovi* and *T. spiralis* internal and external structure examination and sex determination by CLSM. However, future comparative confocal studies on the morphology of other *Trichinella* species are required. More detailed description among taxonomic groups will contribute to the understanding of the relationships among *Trichinella* species.

Financial support. This work is supported by European Regional Development Fund (ERDF), Measure 1.1.1.1 “Industry-Driven Research”, Project No. 1.1.1.1/16/A/211 “Molecular design of new luminescent compounds for diagnostic purposes”.

Author contributions statement. I.G. contributed to the concept and design, analysis and interpretation of data, critical writing or revising the intellectual content, and final approval of the version to be published. E.K. contributed to the concept and design, analysis and interpretation of data, critical writing or revising the intellectual content, and final approval of the version to be published. I.R. contributed to the concept and design, analysis and interpretation of data, critical writing or revising the intellectual content, and final approval of the version to be published. L.M. contributed to the concept and design, analysis and interpretation of data, critical writing or revising the intellectual content, and final approval of the version to be published. S.O. contributed to the development and analysis of dye. G.D. provided *Trichinella spiralis* larvae samples and contributed to the revision of the final version to be published. A.P. performed spectroscopy analyses. I.K. performed species identification. A.B. performed measurements of autofluorescence. M.K. contributed to the concept and design, analysis and interpretation of data, critical writing or revising the intellectual content, and final approval of the version to be published.

References

- Amos WB, White JG & Fordham M (1987). Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Appl Opt* **26**, 3239–3243.
- Ancell H & Pires-daSilva A (2017). Sex-specific lifespan and its evolution in nematodes. *Semin Cell Dev Biol* **70**, 122–129.
- Andy JJ, O’Connell JP, Daddario RC & Roberts WC (1977). Trichinosis causing extensive ventricular mural endocarditis with superimposed thrombosis. Evidence that severe eosinophilia damages endocardium. *Am J Med* **63**, 824–829.
- Bai X, Wu X, Wang X, Guan Z, Gao F, Yu J, Yu L, Tang B, Liu X, Song Y, Wang X, Radu B, Boireau P, Wang F & Liu M (2012). Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* *in vitro*. *Mol Cell Biochem* **360**, 79–88.
- Bai X, Wu X, Wang X, Liu X, Song Y, Gao F, Miao Y, Yu L, Tang B, Wang X, Radu B, Vallee I, Boireau P, Wang F, Zhao Y & Liu M (2011). Inhibition of mammalian muscle differentiation by excretory secretory products of muscle larvae of *Trichinella spiralis* *in vitro*. *Parasitol Res* **110**, 2481–2490.
- Bone LW & Shorey HH (1978). Nematode sex-pheromones. *J Chem Ecol* **4**, 595–612.
- Bouwknegt M, Devleeschauwer B, Graham H, Robertson LJ, van der Giessen JWB & the Euro-FBP Workshop Participants (2018). Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Euro Surveill* **23**, 17-00161.
- Bughdadi FA (2010). Ultrastructural studies on the parasitic worm *Trichinella spiralis*. *J Taibah Univ Sci* **3**, 33–38.
- Davila S, Manso PPA, Bessa ECA, Rodrigues MLA & Dias RJP (2010). Gross anatomy of the musculature and a new description of the reproductive system of *Tanaisia bragai* and *Tanaisia inopina* (Trematoda: Eucotylidae) analysed by confocal laser scanning microscopy. *Acta Zool-Stocholm* **91**, 139–149.
- Deksne G, Segliņa Z, Jahundoviča I, Esīte Z, Bakasejevs E, Bagrade G, Keidāne D, Interisano M, Marucci G, Tonanzi D, Pozio E & Kirjušina M (2016). High prevalence of *Trichinella* spp. in sylvatic carnivore mammals of Latvia. *Vet Parasitol* **231**, 118–123.
- Dobretsov GE (1989). *Fluorescent Probes in the Studies of Cells, Membranes and Lipoproteins*. Moscow, Russia: Nauka.
- Gonta S, Utinans M, Kirilov G, Belyakov S, Ivanova I, Fleisher M, Savenkov V & Kirilova E (2013). Fluorescent substituted amidines of benzanthrone: Synthesis, spectroscopy and quantum chemical calculations. *Spectrochim Acta A* **101**, 325–334.
- Gounaris K, Smith VP & Selkirk ME (1996). Structural organisation and lipid composition of the epicuticular accessory layer of infective larvae of *Trichinella spiralis*. *Biochim Biophys Acta* **1281**, 91–100.
- Goździk K, Odoevskaya IM, Movsesyan SO & Cabaj W (2017). Molecular identification of *Trichinella* isolates from wildlife animals of the Russian Arctic territories. *Helminthologia* **54**, 11–16.
- Hao Y, Zhao X, Yang J, Gu Y, Sun R & Zhu X (2014). Monoclonal antibody targeting complement C9 binding domain of *Trichinella spiralis* paramyosin impairs the viability of *Trichinella* infective larvae in the presence of complement. *Parasite Vector* **7**, 313–320.
- Kapusta P, Machalicky O, Hrdina R, Nepras M, Zimmt MB & Fidler V (2003). Photophysics of 3-substituted benzantrones: Substituent and solvent control of intersystem crossing. *J Phys Chem A* **107**, 9740–9746.
- Kirilova E, Kecko S, Mežaraupe L, Gavarāne I, Pučkīns A, Mickeviča I, Rubeniņa I, Osipovs S, Bulanovs A, Pupiņš M & Kirjušina M (2018a). Novel luminescent dyes for confocal laser scanning microscopy used in Trematoda parasite diagnostics. *Acta Biochim Pol* **65**, 449–454.
- Kirilova E, Mickeviča I, Mežaraupe L, Pučkīns A, Rubeniņa I, Osipovs S, Kokina I, Bulanovs A, Kirjusina M & Gavarane I (2019). Novel dye for detection of callus embryo by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Luminescence* **34**, 353–359.
- Kirilova EM, Puckins AI, Romanovska E, Fleisher M & Belyakov SV (2018b). Novel amidine derivatives of benzantrone: Effect of bromine atom on the spectral parameters. *Spectrochim Acta A* **202**, 41–49.
- Kirjušina M, Deksne G, Marucci G, Bakasejevs E, Jahundoviča I, Daukste A, Zdankovska A, Bērziņa Z, Esīte Z, Bella A, Galati F, Krūmiņa A & Pozio E (2015). A 38-year study on *Trichinella* spp. in wild board (*Sus scrofa*) of Latvia shows a stable incidence with an increased parasite biomass in the last decade. *Parasite Vector* **8**, 1–8.
- Kozek WJ (1975). *Trichinella spiralis*: Morphological characteristics of male and female intestine-infecting larvae. *Exp Parasitol* **37**, 380–387.
- Krupenko DY (2014). Muscle system of *Diplodiscus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous, and ovigerous adults. *Parasitol Res* **113**, 941–952.
- La Rosa G, Marucci G, Rosenthal BM & Pozio E (2012). Development of a single larva microsatellite analysis to investigate the population structure *Trichinella spiralis*. *Infect Genet Evol* **12**, 369–376.
- Li C, Chung Y & Ko R (1999). The distribution of excretory/secretory antigens during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections. *Parasitol Res* **85**, 993–998.
- Lichtenfels JR, Murrell D & Pilitt PA (1983). Comparison of three subspecies of *Trichinella spiralis* by scanning electron microscopy. *J Parasitol* **69**, 1131–1140.
- Liu ZM, Wang C & An CL (1991). Differentiation of the sex of *Trichinella* larvae collected in Changchun. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* **9**, 223–225.
- Masetti M, Locci T, Cecchetti P, Magi M, Malvaldi G & Bruschi F (2004). Nitric oxide synthase immunoreactivity in the nematode *Trichinella britovi*. Evidence for nitric oxide production by the parasite. *Int J Parasitol* **34**, 715–721.
- McCulloch D & Gems D (2003). Evolution of male longevity bias in nematodes. *Aging Cell* **2**, 165–173.
- Murata Y, Nishiyama T & Ishizaka S (1998). Tomographical distribution of *Trichinella spiralis* (Ts) nuclei with laser scanning confocal microscopy (LSCM). *Parasitol Int* **47**, 294.

- Murrell KD (2016). The dynamics of *Trichinella spiralis* epidemiology: Out to pasture? *Vet Parasitol* **231**, 92–96.
- Mutafova T, Dimitrova Y & Komandarev S (1982). The karyotype of four *Trichinella* species. *Z Parasitenkd* **67**, 115–120.
- Neumann M & Gabel D (2002). Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* **50**, 437–439.
- Pires-daSilva A (2007). Evolution of the control of sexual identity in nematodes. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 362–370.
- Pozio E (2007). World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet Parasitol* **149**, 3–21.
- Pozio E, Hoberg E, La Rosa G & Zarlenga DS (2009a). Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect Genet Evol* **9**, 606–616.
- Pozio E & Murrell KD (2006). Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv Parasit* **63**, 367–439.
- Pozio E, Rinaldi L, Marucci G, Musella V, Galati F, Cringoli G, Boireau P & La Rosa G (2009b). Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *Int J Parasitol* **39**, 71–79.
- Ryzhova O, Vus K, Trusova V, Kirilova E, Kirilov G, Gorbenko G & Kinnunen P (2016). Novel benzanthrone probes for membrane and protein studies. *Methods Appl Fluores* **4**, 034007.
- Schnell SA, Staines WA & Wessendorf MW (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* **47**, 719–730.
- Sednev MV, Belov VN & Hell SW (2015). Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: A review. *Methods Appl Fluores* **3**, 042004.
- Segliņa Z, Bakasejevs E, Deksnis G, Spunģis V & Kirjušina M (2015). New findings of *Trichinella britovi* in a European beaver (*Castor fiber*) in Latvia. *Parasitol Res* **114**, 3171–3173.
- Staneva D & Betcheva R (2007). Synthesis and functional properties of new optical pH sensor based on benzo [de] anthracen-7-one immobilized on the viscose. *Dyes Pigments* **74**, 148–153.
- Staneva D, Vasileva-Tonkova E & Grabchev I (2019). pH sensor potential and antimicrobial activity of a new PPA dendrimer modified with benzanthrone fluorophores in solution and on viscose fabric. *J Photochem Photobiol A* **375**, 24–29.
- Stewart MT, Mousley A, Koubkova B, Šebelova Š, Marks NJ & Halton DW (2003). Gross anatomy of the muscle systems and associated innervation of *Apatemon cobitidis* proterorhini metacercaria (Trematoda: Strigeidae), as visualized by confocal microscopy. *Parasitology* **126**, 273–282.
- Transidico P, Bianchi M, Capra M, Pelicci PG & Faretta M (2004). From cells to tissues: Fluorescence confocal microscopy in the study of histological samples. *Microsc Res Techniq* **64**, 89–95.
- Villella JB (1966). Morphologic criteria for distinguishing the sex of *Trichinella spiralis* larvae from muscle. *J Parasitol* **52**, 908–910.
- Wang H, Liang SC, Zhang ZM & Zhang HS (2004). 3-Iodoacetylaminobenzanthrone as a fluorescent derivatizing reagent for thiols in high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* **512**, 281–286.
- Yang X, Liu WH, Jin WJ, Shen GL & Yu RQ (1999). DNA binding studies of a solvatochromic fluorescence probe 3-methoxybenzanthrone. *Spectrochim Acta A* **55A**, 2719–2727.
- Yeates GW & Boag B (2003). Growth and life histories in Nematoda with particular reference to environmental factors. *Nematology* **5**, 653–664.
- Yeates GW & Boag B (2006). Female size shows similar trends in all clades of the phylum Nematoda. *Nematology* **8**, 111–127.
- Zhytniakivska O, Trusova V, Gorbenko G, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I & Kinnunen P (2014). Newly synthesized benzanthrone derivatives as prospective fluorescent membrane probes. *J Lumin* **146**, 307–313.

III

Novel luminescent dyes for confocal laser scanning microscopy used in Trematoda parasite diagnostics*

Elena Kirilova¹✉, Sanita Kecko², Ligita Mežaraupe², Inese Gavarāne¹, Aleksandrs Pučkins¹, Ilona Mickeviča¹, Ilze Rubeniņa², Sergejs Osipovs¹, Andrejs Bulanovs³, Mihails Pupiņš^{2,4} and Muza Kirjušina²

¹Daugavpils University, Institute of Life Sciences and Technology, Department of Biotechnology, Daugavpils, Latvia; ²Daugavpils University, Institute of Life Sciences and Technology, Department of Ecology, Daugavpils, Latvia; ³Daugavpils University, Institute of Life Sciences and Technology, Department of Technology, Daugavpils, Latvia; ⁴Latgales Zoo, Daugavpils, Latvia

Benzanthrone derivatives are now widely used in many industrial and scientific applications as dyes for polymers and textiles. In biochemical, biomedical and diagnostics investigations benzanthrone dyes are used as a lipophilic fluorescent probe since many benzanthrone derivatives demonstrate bright fluorescence and they have ability to intercalate between membrane lipids. The aim of research presented here was to assess the luminescence ability of benzanthrone derivatives using microscopic visualization of biological objects. Accordingly, specimens of freshwater trematodes: *Diplostomum spathaceum*, *Diplodiscus subclavatus* and *Prostotocus confusus*, were stained by novel benzanthrone dyes using different fixatives. The samples were examined under a confocal laser scanning microscope. All of the dyes tested demonstrated good results for digestive and reproductive system visualization. Based on obtained results we conclude that benzanthrone dyes could be used for internal and external structure confocal laser scanning microscopic imaging of trematode specimens.

Key words: Benzanthrone dyes; trematode; confocal laser scanning microscopy

Received: 14 February, 2018; revised: 27 June, 2018; accepted: 12 July, 2018; available on-line: 27 August, 2018

✉ e-mail: jelena.kirilova@du.lv

*Preliminary report presented: Diagnostic of parasites using novel luminescent dyes and confocal laser scanning microscopy. 6th Central European Congress of Life Sciences. EUROBIOTECH, 11–14 September 2017. Krakow, Poland

Abbreviations: CLSM, confocal laser scanning microscopy; mtc., metacercariae

INTRODUCTION

Luminescence imaging techniques are becoming a popular tool to investigate the structure and properties of biological objects. Laser-induced fluorescence is a sensitive approach which gives an opportunity to detect even a single-molecule under appropriate conditions (Wu & Dovichi, 1989; Van der Berg, 2000). Fluorescent molecular dyes, making lipid structures visible through optical techniques, are one of the tools currently used to study cell membranes. Despite a large number of various fluorescent probes that were constructed for bio-imaging (Albani, 2007), the existing membrane probes cannot satisfy the rapidly growing demands of researchers. Benzanthrone dyes attract particular interest due to their useful spectral properties (Carlini *et al.*, 1982; Krasovitsky & Bolotin, 1988). Technological utilization of these com-

pounds is continuously growing, however, their applicability as fluorescent probes in biological assays still remains scantily evaluated. Meanwhile, spectral characteristics of benzanthrone dyes satisfy all the requirements for an ideal fluorescent marker. Bright fluorescence, high extinction coefficient, photo-, thermo- and chemical stability, and reduced background signal make benzanthrone dyes particularly attractive as bio-imaging agents (Yang *et al.*, 1999). Our previous study demonstrated high lipid-associating ability of a series of newly synthesized benzanthrone amino and amidino derivatives (Trusova *et al.*, 2012; Zhytniakivska *et al.*, 2014).

The aim of the study presented here was to estimate new benzanthrone derivatives as luminescent dyes for microscopic visualization of freshwater trematodes. Parasites are important components of biodiversity (Poulin & Morand, 2000) and are suitable model organisms for evaluation of our new dyes and protocol elaboration. Moreover, some trematode species cause different human cancer forms, for example *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* can induce human cholangiocarcinoma, as well as induce other hepatobiliary pathologies (Petney *et al.*, 2013). The spectroscopic properties of novel synthesized compounds were reviewed in this study. Descriptions of synthesis and characterization of new benzanthrone derivatives as luminescent dyes are provided.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Fluorescent benzanthrone dyes AM1 (3-N-(N',N'-dimethylbenzamidino)benzanthrone), AM2 (3-N-(N',N'-dimethylacetamidino)benzanthrone), AM4 (3-N-(N',N'-diethylacetamidino)benzanthrone), AM16 (3-N-[N'-(4-methylphenyl)acetamidino]benzanthrone), and P8 (3-N-piperidinobenzanthrone) were synthesized from 3-aminobenzanthrone or 3-bromobenzanthrone according to procedures described earlier (Kirilova *et al.*, 2008; Kirilova *et al.*, 2009; Gonta *et al.*, 2013). The progress of chemical reactions and purity of products were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates, Silufol UV254, 15×15, 0.2 mm, using the solvent system of benzene/acetonitrile (3:1) as eluent. Column chromatography on silica gel was carried out on the Merck Kieselgel (230–240 mesh) with benzene as eluent. Stock solutions of benzantrones were prepared by dissolving the dyes in ethanol or chloroform. All other chemicals were of analytical grade (Aldrich Chemical Company) and used without further purification.

Model organisms. Fish and amphibian organs were investigated by compression method (Khalil *et al.*, 2014) under a stereomicroscope SMZ800 (Nikon, Japan), magnification 15–30 \times . Freshwater trematode species: *Diplostomum spathaceum*, *Diplodiscus subclavatus* and *Prostotocus confusus* were collected from eyes, as well as digestive tracts by opening abdominal cavity of their respective hosts (Justine *et al.*, 2012). Larval (metacercariae) and adult forms (marita) were used.

Fixation and staining. Each trematode species was fixed in a different fixative: *D. spathaceum* metacercariae (mtc.) in 96% ethanol, adult *D. subclavatus* in Carnoy's solution (6:3:1 – absolute ethanol: chloroform: glacial acetic acid) adult *P. confusus* in AFA solution (17:2:1 – 85% ethanol: formalin: glacial acetic; pH=4.5) for 1 hour, washed and stored in 96% ethanol at 4°C until required. The study design was as follows: all of the prepared specimens were stained in five different benzanthrone dyes: AM1, AM2, AM4, AM16 and P8 (dissolved in ethanol, molar concentration 10⁻⁴M). After 10 minutes, the specimens were washed three times with 70% ethanol and were dehydrated in 70, 80 and 96% ethanol in the ascending order. Every step lasted 5–10 minutes, depending on thickness of the parasites' body wall. Next, ethanol-xylene (1:1) solution was used to obtain appropriate transparency changes under stereomicroscope. For the thickest specimens (*D. subclavatus* and *P. confusus*) an additional step with 100% xylene was used. Specimens were mounted in the Canada balsam (Sigma-Aldrich, 60610) and then were covered with a square coverslip (24 \times 24), dried and kept in the dark until examination.

Microscopy. Microscopic observation was performed by using a high speed multiphoton confocal laser scanning microscope Nikon Eclipse Ti-E configured with A1 R MP inverted microscope system and equipped with digital sight DS-U3 camera (Nikon, Japan). Images of the specimens were processed using NIS Elements Advanced Research 3.2 64-bit software (Nikon, Japan). Slides were observed at various magnifications, from \times 100 to \times 400. Fluorescence was induced by using the following excitation laser wavelengths: (i) λ =488 nm with the FITC filter, (ii) λ =561 nm with the TRITC filter. Objectives used: Plan-Apo 10 \times /0.45; Plan-Apo 20 \times /0.75; Plan-Apo 40 \times /0.95. Appropriate image modifications were obtained using Corel PHOTO-PAINT X6 (Corel Corporation, Canada).

RESULTS

The target dyes were synthesized in high yields by condensation of 3-amino-benzanthrone or 3-bromobenzanthrone with appropriate amidino or amino derivatives. Chemical structures of the studied benzanthrone dyes are presented in Fig. 1.

The investigated substances belong to the class of solvatochromic dyes, which are among the oldest and most established membrane probes. These dyes exhibit strong changes in their dipole moments upon electronic excitation. Dipole-dipole interactions and specific interactions of these dye molecules with their environment change the energy of electronic transitions, and thus shift the maxima of their excitation and emission spectra (Kirilova *et al.*, 2009; Gonta *et al.*, Kirilova *et al.*, 2008).

All of the five investigated benzanthrone dyes are suitable for confocal laser scanning microscopy (CLSM) of animal origin specimens. Not all combinations of dyes and fixatives were provided with pictures because of similar imaging results. Obviously, the target dyes as

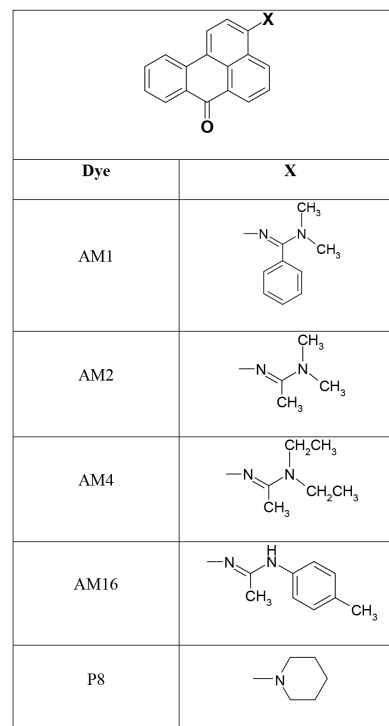


Figure 1. Chemical structures of the dyes used

highly lipophilic substances interacted with biological objects in the first association with the most hydrophobic parts of the cell – their membranes.

Microscopic examination of *D. spathaceum* mtc. fixed in 96% ethanol indicated high applicability of all studied luminescence dyes for visualization of the trematode species. The parasites' bodies were elongated and oval-shaped. Digestive tract stained very well in most parts of the mtc. specimens. Ventral sucker situated mid-ventrally. Under the ventral sucker, a relatively large holdfast organ was visualized. The oral sucker was located at anterior end of the body and continued into the muscular pharynx. Two intestinal caeca reached the end of the holdfast organ (Fig. 2). Two well developed pseudo suckers were visualized at each side of the oral suckers. The primary excretory system was stained (Figs. 2 and 3). In some of the mtc. Specimens, large amounts of rounded calcareous bodies were revealed which extended from the oral sucker to the holdfast organ (Fig. 3).

All stained specimens of adult *D. subclavatus* trematode in tandem with Carnoy's fixative, on the one hand, exhibited better results for visualization of small, taxonomically important skeletal elements, as well as oral and accessory suckers and cavity of the accessory sucker. On the other hand, these specimens did not show internal organs and structures at appropriate resolution level.

Target benzanthrone dyes, together with AFA fixative, displayed excellent visualization of internal and external structures. All of the revealed internal and external structures were clearly visible and easily recognizable. Change of focus gave an opportunity to get detailed images of different organs of *P. confusus*. External structure images showed that the parasites' bodies were round-shaped, cuticula was covered with spines (Fig. 4). Two of the same size suckers were revealed – an oral sucker, located at the anterior end of the body, and a ventral sucker situated mid-ventrally. Shape of cirrus (male copulatory organ) was clearly visible.

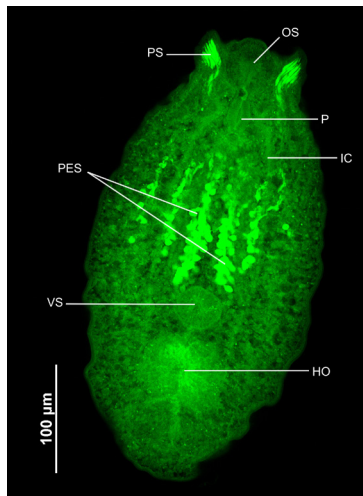


Figure 2. *Diplostomum spathaceum* mtc. stained with AM16 OS, oral sucker; PS, pseudo suckers; P, pharynx; IC, intestinal caeca; VS, ventral sucker; HO, holdfast organ; PES, primary excretory system. Picture obtained with 488 nm laser. Magnification $\times 200$; laser power 29.3; pinhole 54.1

Visualization of internal structure revealed that all of the variations of evaluated dyes and AFA fixative in adult *P. confusus* trematode specimens presented a well stained digestive system (Fig. 5). Directly behind the oral sucker, the pharynx bulbar was visualized which connected to the oesophagus, hidden under the eggs. It was bifurcated, forming two intestinal caeca. The intestines were shortened and did not reach the ventral sucker. Reproductive system also stained well in the adult parasite stage specimens. Cirrus, bursa and plenty of eggs were clearly visible throughout the length of the parasite. Reproductive bursa was large, located near the ventral sucker. The eggs were especially brightly fluorescent. Spines were also easily detected around the parasites' bodies.

DISCUSSION

Benzanthrone derivatives are polyaromatic hydrophobic substances. Due to planar structure and high lipophilicity of their molecules, they effectively interact with

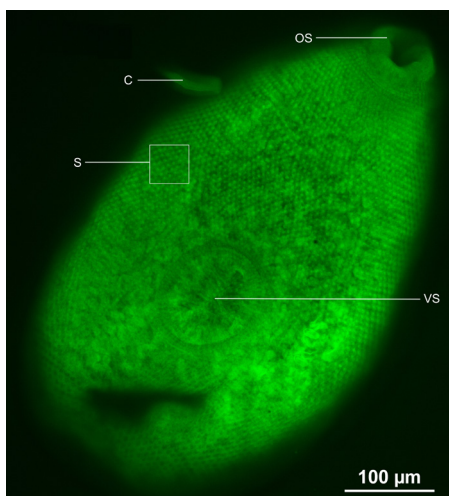


Figure 4. Adult *Prostotocus confusus* stained with AM1 (external structure) S, spines; OS, oral sucker; VS, ventral sucker; C, cirrus. Picture was obtained with 488 nm laser. Magnification $\times 200$; laser power 36.2; pinhole 137.3

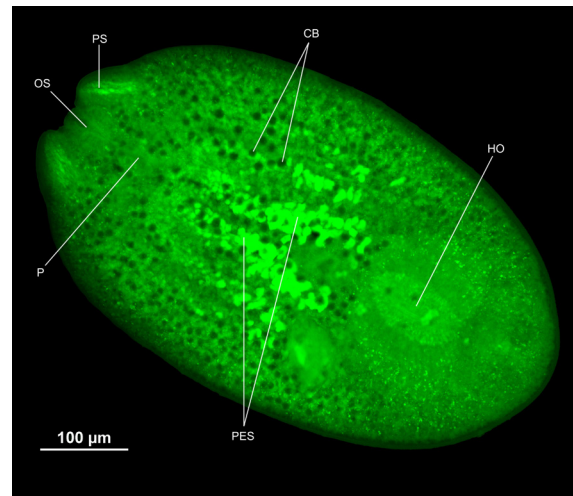


Figure 3. *Diplostomum spathaceum* mtc. stained with AM2 OS, oral sucker; PS, pseudo suckers; P, pharynx; HO, holdfast organ; CB, calcareous bodies; PES, primary excretory system. Picture was obtained with 488 nm laser. Magnification $\times 200$; laser power 38.9; pinhole 158.4

membrane lipids. Nowadays, some benzanthrone derivatives are widely used as fluorescent dyes and probes. In this context, we decided to design new benzanthrone luminescent dyes to visualize cell membranes due to these dyes' localization within membrane lipids. Benzanthrone derivatives have many favorable photophysical properties, such as a significant Stokes shift, large extinction coefficient, bright fluorescence, low fluorescence intensity in buffer and high sensitivity of luminescence to the properties of the local environment (Kirilova *et al.*, 2008, 2009; Gonta *et al.*, 2013; Vus *et al.*, 2014).

In previous studies absorption and emission spectra of target dyes were recorded in two different organic solvents and in solid state upon excitation of the samples at the lowest energy absorption band (Table 1). The electronic absorption spectra of the novel synthesized dyes showed bands around 250–280 nm and a broad long-wave band around 450–470 nm ($\log e = 3.80\text{--}4.60$), which has a charge transfer character, due to $\pi \rightarrow \pi'$ electron transfer during the $S_0 \rightarrow S_1$ transition. The charge

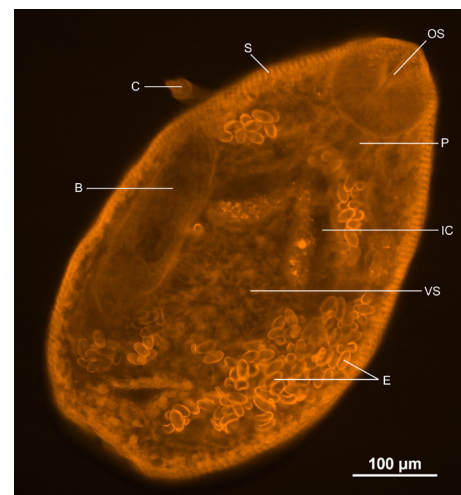


Figure 5. Adult *Prostotocus confusus* stained with AM1 (internal structure) OS, oral sucker; P, pharynx; IC, intestinal caeca; VS, ventral sucker; E, eggs; S, spines; B, bursa; C, cirrus. Picture was obtained with 563 nm laser. Magnification $\times 200$; laser power 32.4; pinhole 127.6

Table 1. Absorption and fluorescence data of the studied dyes at 10⁻⁵ M in solutions

Compound	Absorption I _{abs} (log e), nm		Fluorescence I _{emr} , nm		References
	CHCl ₃	EtOH	CHCl ₃	EtOH	
AM1	470.2 (4.36)	469.5 (4.61)	611	655	Kirilova <i>et al.</i> , 2009; Gonta <i>et al.</i> , Kirilova <i>et al.</i> , 2008
AM2	464.0 (4.09)	461.6 (4.08)	614	677	
AM4	467.0 (4.17)	472.8 (4.14)	615	670	
AM16	448 (3.94)	464 (3.80)	603	662	
P8	458 (4.13)	457 (4.01)	630	670	

transfer in benzanthrone dyes occurs from the electron donor-acceptor interaction between electron-donating substituents at a C-3 position and the electron-accepting carbonyl group of the chromophoric system (Khrolova *et al.*, 1984).

The compounds used are strongly fluorescent in solutions in the region of 603–630 nm (in chloroform) to 655–677 nm (in ethanol). The effect of the polarity of the medium on the fluorescence is more pronounced than on the absorption spectrum. This is because the intramolecular charge transfer effect leads to a large dipole moment in the excited state. The different behaviour in absorption and emission is related to the magnitude of the solvent effect on the energy of the ground and excited states during electron transition.

Later, several benzanthrone dyes were synthesized to verify changes in the physicochemical properties of a lipid bilayer (Trusova *et al.*, 2012; Ryzhova *et al.*, 2016), and to identify and characterize fibrillar aggregates of lysozyme (Vus *et al.*, 2014).

At present, CLSM is widely used to study various species' morphological and physiological structures in fixed trematode specimens (Jurberg *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2017). Souza and coworkers (Souza *et al.*, 2011) utilized hydrochloric carmine to observe trematode reproductive system by CLSM. Souza and coworkers (Souza *et al.*, 2013) used CLSM to characterize morphology of encysted, activated, breached and excysted stages of metacercaria.

Nowadays, CLSM is an important method in biology studies and becomes more applicable in medicine investigations, e.g. cancer diagnostics, such as pancreatic cancer (Durko & Malecka-Panas, 2015) and skin melanoma (Bragaa *et al.*, 2012; Squoros *et al.*, 2014; Farnitani *et al.*, 2015). Kirilova and coworkers (Kirilova *et al.*, 2012) used benzanthrone dye ABM (analogue of dye P8) as fluorescent biomarker in colorectal cancer detection. The obtained results revealed that measurements of ABM spectral characteristics could be a potentially useful approach to estimate the immune status of gastrointestinal patients.

Our study showed no evidence of detailed visualization of body muscle structure, excluding muscular organ pharynx, and oral and ventral suckers. The general pattern of the trematode body wall musculature organization includes three muscle layers as follows: circular, longitudinal, and diagonal (Halton, 2014). More complicated methods are needed to detect muscle layers, e.g. Krupenko (2014) used 4% solution of paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) as fixative following by staining with TRITC-conjugated phalloidin for *D. subclavatus* specimens. Phalloidin has been found to bind to polymeric and oligomeric forms of actin. (Oda *et al.*, 2005). Benzanthrone dyes are able to bind to such proteins as human serum albumin and amyloid fibrils of lysozyme as well (Gorbenko *et al.*, 2010; Ryzhova *et al.*, 2016).

Rozario and Newmark (Rozario & Newmark, 2015) study demonstrated that the nervous system and other sensory structures of *Hymenolepis diminuta* tapeworm were stained with anti-synapsin antibodies. Like other flatworms, adult *H. diminuta* possesses a nervous system with both, central and peripheral components. Two lateral nerve cords, two median nerves and cephalic ganglia were well stained. In the study present here none of the nervous system parts were detected using each of the target dyes: AM1, AM2, AM4, AM16 and P8.

The obtained results demonstrate that the dehydration step is crucially important, because presence of unsubstituted water in the cell structure prevents obtaining subsequent appropriate transparency. Shigin (Shigin, 1996) used a dehydration step in staining trematodes for light microscopy, and the study presented here shows that dehydration is applicable in newly developed protocol for CLSM.

Our results also revealed that parasites with thin-walled structures (e.g. Diplostomatidae family) do not require an additional step of enlightenment with 100% xylene, since the absolute xylene can deform the shape of sensitive specimens. On the other hand, it is an optional step for parasites with thick wall, especially with external spines, which improves visualization of organs and inner structures.

It is required to use lasers in descending order of wave length to obtain better results.

With growing intensity of laser, structures become better visualized; however maximal intensity of lasers makes specimens absolutely unusable. Laser beam with a wavelength of 405 nm was not used in this study because its impact on biological objects is destructive and generates tissue auto fluorescence.

In previous investigations location of benzanthrone dyes in model membranes was revealed by Förster resonance energy transfer and red edge excitation shift approach (Zhitniakivska *et al.*, 2014; Ryzhova *et al.*, 2016). The obtained results show that due to high lipophilicity dye P8 can penetrate into hydrophobic region of the membrane. Dye P8 is situated in the phospholipid head-group region, although other dyes prefer binding sites which are closer to the membrane surface. It was found by Ryzhova and coworkers (Ryzhova *et al.*, 2016) that dyes AM2 and AM4 possess a considerably lower lipid-associating ability when compared to P8.

We have observed a small offset of maximal luminescence peak. It is important to keep in mind, that each cell of organism has autofluorescence in the blue-yellow region of spectrum and there may be interference with such fluorophores as proteins containing aromatic aminoacids, NAD(P)H, flavins and lipopigments (Monici, 2005). Our dyes experimentally demonstrated fluorescence in the red region of the spectrum, however, stained specimens had the displacement of fluorescence into a more short-wave region. That could be a result of more hydrophobic conditions (a higher content of lipids,

dehydration by ethanol). Also, the action of the fixative may result in the appearance of side luminescence. For example, using formalin-containing fixative mixtures resulted in bright luminescence of cells in the yellow-green region of the spectrum (Alfano *et al.*, 1984).

The investigated fluorophores were successfully applied to the fluorescent imaging of objects and identification of studied parasite species. These dyes present opportunities for biology researchers for further studies. In further studies we are planning to use more luminescent dyes for microscopic visualization of trematodes and optimize staining protocols.

CONCLUSION

In conclusion, the study presented here has been undertaken to evaluate the potential of the novel benzanthrone dyes to visualise trematode species. The target dyes absorb at 450–470 nm and emit at 603–677 nm. The target dyes displayed a positive solvatochromism and demonstrated their potential as luminescent probes for hydrophobic parts of the cell – membranes. Our results suggest a high compatibility of the new dyes tested with different common used fixatives, such as AFA and ethanol. These combinations gave good results of digestive and reproductive system imaging. Our study highlights the universalism and good staining properties of the benzanthrone dyes. They allow to get a clear visualization of parasites' internal and external structures.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by European Regional Development Fund (ERDF), Measure 1.1.1.1 “Industry-Driven Research”, Project No. 1.1.1.1/16/A/211 „Molecular design of new luminescent compounds for diagnostic purposes”.

REFERENCES

- Albani JR (2007) *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. Oxford, Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470692059>
- Alfano RR, Tata DB, Corsero J, Tomashefsky P, Longo FW, Alfano MA (1984) Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. *IEEE J Quantum Elect* **20**: 1507–1511. <https://doi.org/10.1109/JQE.1984.1072322>
- Borges N, Costa VS, Mantovani C, Barros E, Santos EGN, Marfa CL, Santos CP (2017) Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidioopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*. *J Fish Dis* **40**: 191–203. <https://doi.org/10.1111/jfd.12504>
- Braga JC, Cao T, Oliviero MC, Duprata J, Rabinovitz HS, Rezze GG (2012) *In vivo* confocal microscopy: a promising diagnostic method for cutaneous oncology. *J Clin Exp Dermatol Res* **S3**. <https://doi.org/10.4172/2155-9554.S3-002>
- Carlini F, Paffoni C, Boffa G (1982) New daylight fluorescent pigments. *Dyes Pigm* **3**: 59–69. [https://doi.org/10.1016/0143-7208\(82\)80013-2](https://doi.org/10.1016/0143-7208(82)80013-2)
- Durko Ł, Malecka-Panas E (2015) The role of confocal microscopy in the diagnosis of pancreatic neoplasms. *Postępy Nauk Medycznych* **28**: 38–41 (in Polish?)
- Farnetani F, Scope A, Braun RP, Gonzalez S, Guitera P, Malveyh J, Manfredini M, Marghoob AA, Moscarella E, Oliviero M, Puig S, Rabinovitz HS, Stanganelli I, Longo C, Malagoli C, Vinceti M, Pellacani G (2015) Skin cancer diagnosis with reflectance confocal microscopy reproducibility of feature recognition and accuracy of diagnosis. *JAMA Dermatol* **151**: 1075–1080. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.0810>
- Gonta S, Utinans M, Kirilov G, Belyakov S, Ivanova I, Fleisher M, Savenkov V, Kirilova E (2013) Fluorescent substituted amidines of benzanthrone: synthesis, spectroscopy and quantum chemical calculations. *Spectrochim Acta A* **101**: 325–334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.104>
- Gorbenko G, Trusova V, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I, Vasilev A, Kaloyanova S, Deligeorgiev T (2010) New fluorescent probes for detection and characterization of amyloid fibrils. *Chem Phys Lett* **495**: 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.07.005>
- Halton DW, Maule AG (2004) Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis. *Can J Zool* **82**: 316–333. <https://doi.org/10.1139/z03-221>
- Jurberg AD, Pascarelli BM, Pelajo-Machado M, Maldonado A Jr, Mota EM, Lenzi HL (2008) Trematode embryology: a new method for whole-egg analysis by confocal microscopy. *Dev Genes Evol* **218**: 267–271. <https://doi.org/10.1007/s00427-008-0209-0>
- Justine JL, Briand MJ, Bray RA (2012) A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. *Parasitol Res* **111**: 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2845-6>
- Khalil MI, El-Shahawy IS, Abdelkader HS (2014) Studies on some fish parasites of public health importance in the southern area of Saudi Arabia. *Rev Bras Vet Parasitol* **23**: 435–442. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014082>
- Khrolova OR, Kunavin NI, Komlev IV, Tavrizova MA (1984) Spectral and luminescence properties of phosphorylmethyl derivatives of 3-aminobenzanthrone. *J Appl Spectr* **41**: 771–775. <https://doi.org/10.1007/BF00657690>
- Kirilova E, Kalnina I, Kirilov G, Gorbenko G (2012) Fluorescent biomarker in colorectal cancer. In *Colorectal Cancer Biology – from Genesis to Tumor*. Ettarh R, eds, pp 429–446. China, InTech. <https://doi.org/10.5772/28733>
- Kirilova EM, Belyakov SV, Kalnina I (2009) Synthesis and study of N,N-substituted 3-amidinobenzanthrones. In *Topics in Chemistry & Materials Science*. Vayssilov G, Nikolova R eds, pp 19–28. Heron Press.
- Kirilova EM, Kalnina I, Kirilov GK, Meirovics I (2008) Spectroscopic study of benzanthrone 3-N-derivatives as new hydrophobic fluorescent probes for biomolecules. *J Fluoresc* **18**: 645–648. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0340-3>
- Krasovitsky BM, Bolotin BM (1988) *Organic luminescent materials*. NY, VCH Publishers
- Krupenko DY (2014) Muscle system of *Diplo-discus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous, and ovigerous adults. *Parasitol Res* **113**: 941–952. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3726-3>
- Monica M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* **11**: 1387–2656. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2)
- Oda T, Namba, Maeda Y (2005) Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by x-ray fiber diffraction analysis. *Biophys J* **88**: 2727–2736. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.047753>
- Petney TN, Andrews RH, Saijuntha W, Wenz-Mücke A, Sithithaworn P (2013) The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini*. *Int J Parasitol* **43**: 1031–1046. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.007>
- Poulin R, Morand S (2000) The diversity of parasites. *Q Rev Biol* **75**: 277–293. <https://doi.org/10.1086/393500>
- Rozario T, Newmark PA (2015) A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Exp Parasitol* **158**: 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.015>
- Ryzhova O, Vus K, Trusova V, Kirilova E, Kirilov G, Gorbenko G, Kinnunen P (2016) Novel benzanthrone probes for membrane and protein studies. *Methods Appl Fluoresc* **4**: 034007. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/3/034007>
- Sgourou D, Pellacani G, Katoulis A, Rigopoulos D, Longo C (2014) Confocal microscopy in diagnosis and management of melasma: review of literature. *J Pigment Disord* **S1**: 004. <http://dx.doi.org/10.4172/JPD.S1-005>
- Shigin AA (1996) Morphological criteria of the species in cercaria of the genus *Diplostomum* (Trematoda: Diplostomidae) and methods for their study. *Parazitologija* **30**: 425–439 (what language?).
- Souza J, Garcia J, Neves RH, Machado-Silva JR, Maldonado A (2013) *In vitro* excystation of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) metacercariae assessed by light microscopy, morphometry and confocal laser scanning microscopy. *Exp Parasitol* **135**: 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.10.009>
- Souza J, Garcia JS, Manso PP, Neves RH, Maldonado A Jr, Machado-Silva JR (2011) Development of the reproductive system of *Echinostoma paraensei* in *Mesocricetus auratus* analyzed by light and confocal scanning laser microscopy. *Exp Parasitol* **128**: 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.005>
- Trusova V, Kirilova E, Kalnina I, Kirilov G, Zhytniakivska O, Fedorov P, Gorbenko G (2012) Novel benzanthrone aminoderivatives for membrane studies. *J Fluoresc* **22**: 953–959. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-1035-8>
- Van der Berg A, Olthuis W, Bergveld P (2000) *Micro total analysis systems 2000*. Dordrecht, Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-2264-3>

- Vus K, Trusova V, Gorbenko G, Sood R, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I, Kinnunen P (2014) Fluorescence investigation of interactions between novel benzanthrone dyes and lysozyme amyloid fibrils. *J Fluoresc* **24**: 493–504. <https://doi.org/10.1007/s10895-013-1318-3>
- Wu S, Dovichi NJ (1989) High-sensitivity fluorescence detector for fluorescein isothiocyanate derivatives of amino acids separated by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* **480**: 141–155. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)84284-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)84284-9)
- Yang X, Liu W-H, Jin W-J, Shen G-L, Yu R-Q (1999) DNA binding studies of a solvatochromic fluorescence probe 3-methoxybenzanthrone. *Spectrochim Acta A* **55**: 2719–2727. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(99\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(99)00161-4)
- Zhytniakivska O, Trusova V, Gorbenko G, Kirilova E, Kalnina I, Kirilov G, Molotkovsky J, Tulkki J, Kinnunen P (2014) Location of novel benzanthrone dyes in model membranes as revealed by resonance energy transfer. *J Fluoresc* **24**: 899–907. <https://doi.org/10.1007/s10895-014-1370-7>
- Zhytniakivska O, Trusova V, Gorbenko G, Kirilova E, Kirilov G, Kalnina I, Kinnunen P (2014) Newly synthesized benzanthrone derivatives as prospective fluorescent membrane probes. *J Luminesc* **146**: 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.10.015>

IV

STAINING OF ECONOMICALLY IMPORTANT PARASITIC NEMATODES BY DEVELOPED DERIVATIVES OF BENZANTHRONE LUMINOPHORE

MSc. biol. Inese Gavarane

BSc. chem. Ligita Mezaraupe

MSc. biol. Ilze Rubenina

Dr. biol. Muza Kirjusina

Dr. chem. Elena Kirilova

Daugavpils University, **Latvia**

ABSTRACT

Nematodes belonging to the genus *Trichinella* are zoonotic parasites with a high impact on the animal trade and human health. Foodborne pathogens of *Trichinella* genus are known as causative agents of human trichinellosis, a disease that is a public health hazard. According to the Commission Regulation (EU) No. 2015/1375 all animals, which are potential carriers of *Trichinella* spp. larvae and are for human consumption, must be tested according to one of the approved tests. For assessment of developed benzanthrone luminophore P13 the *Trichinella britovi* larvae samples were selected. Confocal laser scanning fluorescence microscopy was applied to visualize stained larvae. Developed technique is appropriate and demonstrated sufficient results for samples preserved in 96% ethanol for up to three years long period and for larvae obtained from two years frozen muscle samples. Staining of internal organs by developed technique may be an invaluable source of data for studies of parasite structure and variety.

Keywords: benzanthrone luminophore P13; *Trichinella britovi*; confocal laser scanning fluorescence microscopy

INTRODUCTION

Nematoda is diverse phylum and includes many economically important parasitic species. They range in size from 0.2 mm to over 6 m and are found in variable habitats. Nematode species are important regulators of plant and animal production. Variable plants and animals can be exploited by at least one species of parasitic nematode [1].

Nematode worms of the genus *Trichinella* are important zoonotic parasites infecting more than a hundred species of mammals, birds and reptiles worldwide. The occurrence of trichinellosis in humans is related to cultural eating habits, including the consumption of raw or undercooked meat infected with the larvae. Infection of humans is caused by consumption of raw or undercooked meat of animals infected with the larvae. Currently, 12 taxa in *Trichinella* genus are recognised and identification mainly is based on molecular biology techniques, due there are no morphological features to specify larvae [2].

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) is a powerful technique that is successfully applied for the studying of the external and internal anatomy of different parasites. Additionally, CSLM, due to its optical sectioning features, high spatial resolution and minimal sample manipulation, is widely used for the non-destructive

examination of thick biological samples. Staining with appropriate dyes is promoted the fluorescence of examined specimen [3].

Currently, fluorescence imaging tools are important in diagnostics of parasites. Almost all developed protocols for staining of parasites are time consuming and designed for fresh material [4]. There are stored in different collections of parasites worldwide, which can be used for studies. Accordingly, the development of new luminophores to visualize, quantify, identify and study conserved or frozen parasites is required.

Different structure benzantrone luminophore dyes emit light in different spectral regions from yellow-green to red-purple. These dyes are characterized by bright solid-state fluorescence, large extinction coefficient, excellent colour characteristics, high thermo and photostability [5].

The present study aimed to develop benzantrone luminophore dye for staining of nematodes larvae samples, that were preserved in 96,6% ethanol and frozen in muscles for five years and visualize stained samples using confocal scanning laser microscopy.

MATERIALS AND METHODS

General

All reagents were of analytical grade (Aldrich chemical company, Germany) and were used as received. The progress of the chemical reactions and the purity of products were monitored by a thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates, Silufol UV254, 15x15, 0.2 mm, using the solvent system benzene/acetonitrile (3:1) as eluent. Column chromatography on silica gel was carried out on Merck Kieselgel (230-240 mesh) with benzene as eluent. Melting points were measured on a Kofler apparatus and were left intact. Structure of organic compound was determined by infrared (IR), ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and mass spectroscopy (MS). IR spectra was recorded on the Shimadzu Prestige-21FT spectrometer in KBr pellets. ¹H NMR spectra was recorded on the Bruker Avance 300 spectrometer operating at 400 MHz in CDCl₃ (with TMS as an internal standard) at an ambient temperature. Chromate-mass spectroscopic studies were carried out using the QP2010 chromatograph (Shimadzu, Japan); EI ionization, 70 eV, the mass range 39-450 *m/z*.

Spectroscopic measurements

Spectral properties of the investigated compound were measured in seven organic solvents with concentrations 10⁻⁵ M at an ambient temperature in 10 mm quartz cuvettes. All solvents were of p.a. or analytical grade. The absorption spectra were obtained using the UV-visible spectrophotometer Specord[®] 80 (Analytik Jena AG, Germany). The fluorescence emission spectra was recorded on a FLSP920 (Edinburgh Instruments Ltd., Scotland) spectrofluorimeter using Rhodamine 6G ($\Phi_0=0.88$), as a standard.

Synthesis of 3-N-[N'-(2-pyridyl)piperazino]benzantrone P13

A mixture of 3-bromobenzanthrone (0.3 g, 1 mmol), 1-(2-pyridyl)piperazine (0.5 ml, 3 mmol), and triethylamine (5 ml) was heated at reflux for 5 h. After cooling, the product was filtered off and dried. Chromatography on a 1.5x30 cm column packed with silica gel 40/100 gave 0.23 g (59%) of compound A as orange crystals with m.p. 137 °C.

IR ν (KBr), cm⁻¹: 1578 (C=C); 1652 (C=O); 2833, 2931, 3073 (C-H).

^1H NMR δ , ppm. (CDCl_3): 4.01-4.23 (m, 8H); 6.45 (d, 1H, $J=8.5$ Hz); 7.37-7.42 (m, 3H); 7.48 (s, 1H); 7.50 (s, 1H); 7.61 (td, 1H, $J=7.8$; 1.5 Hz); 7.78 (t, 1H, $J=7.8$ Hz); 8.07 (d, 1H, $J=8.2$ Hz); 8.11 (d, 1H, $J=8.5$); 8.40 (dd, 1H, $J=1.2$ Hz); 8.42 (dd, 1H, $J=1.4$ Hz); 8.81 (dd, 1H, $J=7.4$; 1.2 Hz).

^{13}C NMR δ , (CDCl_3): 56.34, 63.86, 76.69, 77.33, 106.83, 117.20, 121.98, 122.30, 123.34, 125.44, 126.07, 126.52, 126.63, 127.89, 129.07, 129.21, 129.26, 129.57, 130.02, 131.99, 132.02, 133.17, 134.20, 136.78, 143.94, 184.02.

MS m/z : 391 (25) [M^+], 322 (29), 285 (45), 284 (36), 268 (12), 257 (15), 256 (20), 228 (14), 201 (15), 133 (10), 119 (11), 107 (100), 79 (41), 78 (20).

Examination of parasites

In current study, larvae samples of *Trichinella britovi* parasites were used. One part of examined samples were preserved in 96, 6% ethanol for 1-5 years. Second part of samples were digested according Regula 2015/1375 from muscles of red fox (*Vulpes Vulpes*) legs stored for 1-5 years at -20 °C. For staining procedure novel benzanthrone derivative luminophore P13 dissolved in ethanol was used, molar concentration of solution 10^{-4} M. Object was placed into the lactic acid for 10 s to get appropriate transparency of the sample and after was washed three times in 70 % ethanol. Further, object was placed in to the current due for 5 min and again was washed in 70 % ethanol. Specimens were mounted in Canada balsam (Sigma-Aldrich, Germany) and then were covered with a square coverslip (24x24 mm). Finally, coverslip`s edges were fixed with the adhesive glue (Marabu, Germany), dried and were immediately observed under microscope.

A high speed multiphoton CLSM Nikon Eclipse Ti-E configured with A1 R MP inverted microscope system and equipped with digital sight DS-U3 camera (Nikon, Japan) was used. CLSM images of the specimens were processed using the NIS Elements Advanced Research 3.2 64-bit software (Nikon, Japan). Slides were observed at various magnifications, from $\times 400$ to $\times 1000$. Fluorescence was excited by following laser wavelengths: (i) $\lambda = 488$ nm with FITC filter, (ii) $\lambda = 561$ nm with TRITC filter. Appropriate image modifications were obtained using Corel Photo-Paint x6 (Corel Corporation, Canada).

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and spectral characterization

Benzanthrone luminescent dyes, a well-known class of luminophores that emit in the spectral region from yellow–green to red–purple, have found manifold applications in a variety of fields [6].

In previous research it is noted that emissive benzanthrone dyes can be used as luminescent dye for biological object investigations [7]. In this connection, the design of new luminescent benzanthrone derivatives is important objective for the search of new effective luminophores for biological tissues or cells visualization.

For several years our research group has been working on benzanthrone derivatives, which appeared to be particularly interesting because they lead to perspective luminescent materials. In previous works, a series of benzanthrone N-substituted derivatives were prepared and studied [7]. Continuing these works, herein we report the photophysical properties of new 3-substituted benzanthrone derivative, namely, 3-N-

[N'-(2-pyridyl)piperazino]-7H-benzo[de]anthracen-7-one in different solvents of varying polarities. The chemical structure of new benzanthrone aminoderivative investigated in the present work is shown in Figure 1.

The synthesis of the dye was realized by the nucleophilic substitution reaction of bromine atom of 3-bromobenzanthrone and 1-(2-pyridyl)piperazine (yield of the main product was 59%). The synthesized dye is crystalline orange coloured substance. The prepared derivative was characterized by their melting point and by spectral data on absorption and fluorescence parameters. IR, ¹H NMR, and mass spectroscopic studies confirmed the chemical structure of the new dyes.

In the ¹H NMR spectra of the dye, the multiple signal at 4.01-4.23 ppm of CH₂ group of piperazine moiety, and signals with various multiplicity (from 6.45 to 8.81 ppm) of aromatic protons of benzanthrone and phenyl residues were found. In the infrared spectrum of the dye the characteristic vibration bands of keto groups (1652 cm⁻¹) and the bands near 2830-3080 cm⁻¹ from C-H vibrations were observed. Obtained dye is readily analysed by mass spectrometry. The electron ionization spectra contain a limited number of strong product ion peaks, one of which corresponds to a molecular ion (M=391).

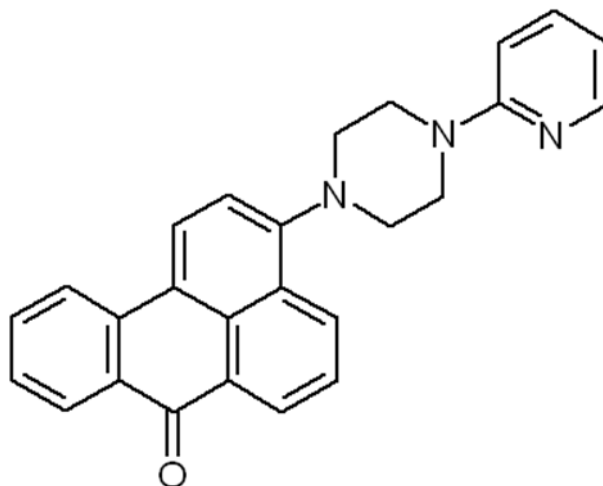


Figure 1. Chemical structure of the newly prepared dye

Absorption and emission spectra of prepared dye have been recorded in eight different organic solvents with a wide range of polarities. The data of absorption and emission band maxima are summarized in Table 1. The absorption and emission spectra for studied derivative are depicted in Figure 2.

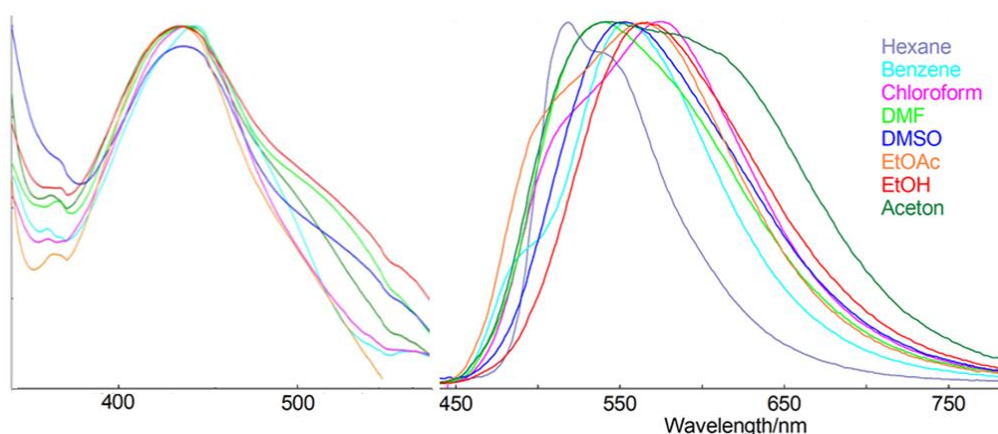
It can be seen that absorption spectra do not show significant variations with solvents. The positions of absorption maxima are situated between 432-441 nm. Obtained luminophore has also a large absorptivity coefficient (3.44-3.91).

Because of benzanthrone derivatives ability to intramolecular charge transfer within chromophoric system, occurring between electron-donating groups in C-3 position and electron-accepting carbonyl group [8] these dyes have a large dipole moment in the excited state, which causes more pronounced effect of polarity of the solvent on position of fluorescence maxima than on the absorption spectrum.

Table 1. Photophysical parameters of studied dye in organic solvents (at concentration 10^{-5} M)

Solvent	Absorption λ_{abs} (lg ϵ), nm	Fluorescence λ_{em} , nm	Stokes shift $\Delta\lambda$, nm
Hexane	432 (3.44)	519	87
Benzene	441 (3.84)	554	113
Ethyl acetate	432 (3.69)	563	131
Chloroform	439 (3.91)	579	140
Acetone	432 (3.34)	543	111
Dimethylformamide	438 (3.75)	540	102
Dimethylsulphoxide	433 (3.80)	553	120
Ethanol	433 (3.79)	566	133

Therefore, the fluorescence spectrum reveals positive solvatochromism when going from non-polar hexane to polar ethanol (bathochromic shift reaches 47 nm). The observed large Stokes shift values for investigated dye (up to 140 nm in chloroform and 133 nm in ethanol solution) indicate the energy losses during the transition from the ground state to the excited state. According to the obtained results it can be concluded that the investigated dye can find application in super-resolution microscopy because super-resolution imaging methods need dyes with large Stokes shifts [9].

**Figure 2.** UV-vis absorption spectra (left) and fluorescence emission spectra (right) of the investigated dye in various organic solvents

Staining of parasites

Described staining technique is appropriate for larvae samples preserved in 96,6 % ethanol for up to three years and for larvae samples from muscles frozen up to two years. During the CLSM microscopy of stained samples differences in morphology structure between frozen and preserved in ethanol samples were not observed. In older samples the degradation of structures was detected.

Despite the fact that newly developed luminophore P13 has the fluorescence initiation at 432-441 nm, in interaction with biological objects we noticed the absorption dislocation in to the more longwave region comparing with pure solvents, in this case 561 nm. Obviously, luminophores' spectral characteristics are changing in different conditions.

Further investigation is required to describe the nature of these changes, but even now we can observe the practical application of this particularity. Longer wavelength emitting is less damaging for the biological specimen. Thereafter for *T. britovi* examination a 561 nm wavelength (Fig. 3A) were used. Laser intensity was increased and two lasers (Fig. 3B) were used at the same time to obtain qualitative data, but the disadvantage of two lasers application is very fast decrease of fluorescence intensity [10].

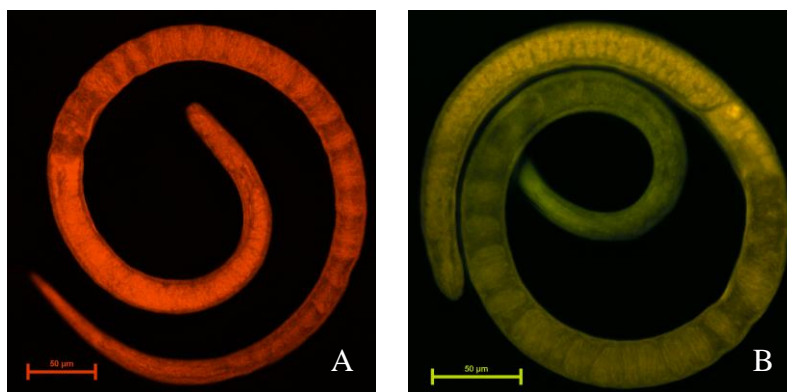


Figure 3. *Trichinella britovi*: A – fluorescence by laser wavelength $\lambda = 561$ nm; B – fluorescence by laser wavelengths $\lambda = 488$ nm and $\lambda = 561$ nm

The investigation of morphological characters of nematodes allow to understand the mechanisms of plant and animal parasitism, how parasites locate and invade hosts, avoid host immunity, and acquire nutrition is important for basic, medical and veterinary science [1].

CONCLUSION

The effect of solvents on the photophysical properties of newly synthesized benzanthrone dye P13 are studied experimentally. The obtained luminophore showed a strong absorbance at 432-441 nm and a significant Stokes shift. The obtained results testify that the fluorescence of investigated derivative is sensible to the changes on polarity of surrounding. The present study may be useful in developing the fluorescence probes of molecules based on the benzanthrone core.

CSLM allows the capture of precise digital images of the fine details of morphological characteristics, which can be analysed using various computer programs. Additionally, can serve as an effective tool for comparing closely related species and poorly described taxa etc. In this study, the potential use of CLSM for the study of nematodes is demonstrated using differently stored specimens of *T. britovi*. This study showed that older specimens on microscope slides stained by developed P13 appeared to be appropriate for CLSM.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by European Regional Development Fund (ERDF), Measure 1.1.1.1 “Industry-Driven Research”, Project No. 1.1.1.1/16/A/211 „Molecular design of new luminescent compounds for diagnostic purposes”.

REFERENCES

- [1] Blaxter M., Koutsovoulos G., The evolution of parasitism in Nematoda, *Parasitology*, UK, vol. 142, S26–S39, 2015.
- [2] Pozio E., Zarlenga D. S., New pieces of the *Trichinella* puzzle, *International Journal of Parasitology*, Australia, vol. 43/issue 12-13, pp 983-97, 2013.
- [3] Laurent M., Johannin G., Gilbert N., Lucas L., Cassio D., Petit P. X., Fleury A., Power and limits of laser scanning confocal microscopy, *Biology of the Cell*, France, vol. 80/issue 2-3, pp 229-40, 1994.
- [4] Ndao M., Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, Egypt, vol. 2009, ID 278246, 2009.
- [5] Bojinov V. B., Grabchev I. K., Synthesis of Ethyl 3-Aryl-1-methyl-8-oxo-8 H-anthra [9, 1-gh] quinoline-2-carboxylates as Dyes for Potential Application in Liquid Crystal Displays, *Organic Letters*, USA, vol. 5, pp 2185-2187, 2003.
- [6] Krasovitskii B. M., Bolotin B. M., *Organic luminescent materials*, Wiley-VCH Publishers, USA, 1988, pp 340.
- [7] Ryzhova O., Vus K., Trusova V., Kirilova E., Kirilov G., Gorbenko G., Kinnunen P., Novel benzanthrone probes for membrane and protein studies. *Methods and Application in Fluorescence*, UK, vol.4/issue 3, ID 034007, 2016.
- [8] Kapusta P., Machalicky O., Hrdina R., Nepras M., Zimmt M. B., Fidler V., Photophysics of 3-substituted benzantrones: substituent and solvent control of intersystem crossing, *The Journal of Physical Chemistry A*, USA, vol. 107, pp 9740-9746, 2003.
- [9] Sednev M. V., Belov V. N., Hell S. W., Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review, *Methods and Application in Fluorescence*, UK, vol. 3, ID 042004, 2015.
- [10] Sanderson M. J., Smith I., Parker I., Bootman M. D., *Fluorescence Microscopy*, Cold Spring Harbor Protocols, USA, vol.10, pdb.top071795, 2014.