

## 7. STRESZCZENIE

Owady pod względem liczby gatunków stanowią najliczniejszą grupę zwierząt. Ich anatomiczno-fizjologiczne przystosowania oraz wysoki potencjał reprodukcyjny sprawia, że zamieszkują różnorodne środowiska i siedliska wszystkich stref klimatycznych. Zróżnicowanie występowania owadów w połączeniu z ich ogromnym potencjałem rozrodczym i w konsekwencji niespotykaną wśród innych zwierząt liczebnością i opornością na patogeny sprawia, że odgrywają one znaczącą rolę w życiu człowieka, zarówno w odniesieniu do jego zdrowia, jak i gospodarki. Wiele gatunków owadów to szkodniki upraw lub wektory groźnych dla człowieka chorób. Z uwagi na wysoką nieselektywność insektycydów, których działanie wpływa niekorzystnie na inne zwierzęta i człowieka oraz możliwość rozwinięcia u owadów długotrwałej odporności poszukuje się, w oparciu o wiedzę na temat fizjologii i biologii rozwoju tej grupy zwierząt, alternatywnych metod zwalczania owadów szkodliwych.

Pierwszym celem tej pracy było zbadanie immunotropowej i gonadotropowej aktywności ośmiu hemocytotoksycznych analogów *Neb*-kolostatyny (SIVPLGLPVPPIGPIVVGPR), peptydu o właściwościach gonadoinhibicyjnych i proapoptotycznych względem hemocytów, u chrząszcza *Tenebrio molitor*. Testowane analogi były zmodyfikowane w pierwszej pozycji łańcucha aminokwasowego *Neb*-kolostatyny resztą Ac-Ser, Asp, Glu, Ala lub Val lub w pozycji czwartej łańcucha aminokwasowego *Neb*-kolostatyny resztą Hyp, Ach lub Ile. W pracy wykazano, że [Ac-Ser<sup>1</sup>]-, [Asp<sup>1</sup>]-, [Glu<sup>1</sup>]-, [Ala<sup>1</sup>]-, [Val<sup>1</sup>]-, [Hyp<sup>4</sup>]-, [Ach<sup>4</sup>]-, [Ile<sup>4</sup>]-kolostatyna znacząco obniżały liczbę hemocytów krążących w hemolimfie larw, poczwarek i osobników dorosłych *T. molitor*, silnie hamowały komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną oraz rozwój jajnika, redukowały liczbę składanych jaj oraz wylęgalsność larw ze złożonych jaj, a także zaburzały metamorfozę tego owada. Badania immunologiczne pozwoliły na identyfikację wśród testowanych analogów czterech najbardziej efektywnych immunoinhibicyjnie analogów, czyli [Ala<sup>1</sup>]-, [Val<sup>1</sup>]-, [Hyp<sup>4</sup>]- i [Ach<sup>4</sup>]-kolostatyny.

Drugim celem pracy było zbadanie możliwości wprowadzenia naturalnego peptydu do wnętrza ciała *T. molitor* za pomocą nanodiamentów (NDs). W pierwszym etapie tych badań udowodniono, że NDs wniknęły przez kutikulę do hemocelu owada i następnie zostały sfagocytowane przez hemocyty oraz w mniejszym stopniu zakumulowane w komórkach ciała tłuszczowego owada. W drugim etapie badań wykazano, że NDs nie wpływały na liczbę hemocytów krążących w hemolimfie, na fagocytozę lateksowych kulek przez hemocyty, na tworzenie nodul i aktywność oksydazy polifenolowej u eksperymentalnie zainfekowanych

bakteriami owadów, nie zakłócały rozwoju jajnika i metamorfozy u *T. molitor*. natomiast powodowały krótkotrwałe opóźnienie składania jaj oraz zmniejszały wylęgłość larw ze złożonych jaj.

Trzecim celem badań było wprowadzenie *Neb*-kolostatyny i jej najbardziej aktywnych analogów ([Ala<sup>1</sup>]-, [Val<sup>1</sup>]-, [Hyp<sup>4</sup>]- i [Ach<sup>4</sup>]-kolostatyny) za pomocą NDs z powierzchni kutikuli do wnętrza ciała owada i wywołanie specyficznych dla tych peptydów efektów w funkcjonowaniu układu immunologicznego, rozmnażaniu i rozwoju owada. Wykazano, że te peptydy przedostały się wraz z NDs z powierzchni kutikuli do hemolimfy owada i efektywnie obniżyły komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną, silnie zahamowały rozwój jajnika, zaburzyły oogenezę i embriogenezę oraz metamorfozę *T. molitor*.

Wyniki przeprowadzonych podstawowych badań dostarczyły wielu nowych informacji na temat efektywności działania analogów *Neb*-kolostatyny u owadów. Wśród testowanych analogów zidentyfikowano cztery najbardziej efektywne w obniżaniu żywotności i liczebności owadów analogi *Neb*-kolostatyny. Ich cząsteczki mogą zostać poddane kolejnym chemicznym modyfikacjom, które mogą jeszcze bardziej podwyższyć ich efektywność i mogą stać się przedmiotem kolejnych badań nad opracowaniem nowych bioinsektycydów. Wykazanie przenikania NDs z powierzchni kutikuli do ciała owada, ich wysokiej biokompatybilności tkankowej oraz możliwości wprowadzenia za ich pomocą efektywnych peptydów przez kutikulę do wnętrza ciała owada przyczyni się do pogłębienia ogólnej wiedzy o efektywnych sposobach wprowadzania bioaktywnych cząsteczek do owada i kontrolowaniu przy ich pomocy liczebności szkodników. Wykazanie przenikania NDs przez kutikulę do wnętrza ciała owada, ich stosunkowo wysokiej biokompatybilności oraz możliwości wprowadzenia do organizmu owada za ich pomocą aktywnych peptydów może przyczynić się do zwiększenia ogólnej wiedzy na temat skutecznych sposobów wprowadzania bioaktywnych cząstek do organizmu owada oraz do znalezienia nowych metod kontrolowania liczby szkodników.

## 8. SUMMARY

In terms of the number of species, insects constitute the most numerous group of animals. Their anatomical and physiological adaptations and high reproductive potential make them inhabit a variety of environments and habitats of all climatic zones. The diversity of the occurrence of insects, combined with their enormous reproductive potential and, consequently, the abundance and resistance to pathogens, unprecedented among other animals, make them play a significant role in human life, both in terms of health and economy. Many species of insects are crop pests or vectors of diseases that are dangerous for humans. Due to the high non-selectivity of insecticides, the action of which adversely affects other animals and humans, and the possibility of developing long-term immunity in insects, alternative methods of controlling harmful insects are sought based on the knowledge about the physiology and the developmental biology of this group of animals.

The first aim of this study was to investigate the immunotropic and gonadotropic activity of eight haemocytotoxic analogues of *Neb*-colloostatin (SIVPLGLPVPIGVVGP), a peptide with the gonadoinhibitory action and the pro-apoptotic action on haemocytes, in the *Tenebrio molitor* beetle. The tested analogues were modified at the first position of the *Neb*-colloostatin amino acid chain with residue of Ac-Ser, Asp, Glu, Ala or Val and at the fourth position of the *Neb*-colloostatin amino acid chain with Hyp, Ach or Ile. This study showed that [Ac-Ser<sup>1</sup>]-, [Asp<sup>1</sup>]-, [Glu<sup>1</sup>]-, [Ala<sup>1</sup>]-, [Val<sup>1</sup>]-, [Hyp<sup>4</sup>]-, [Ach<sup>4</sup>]- and [Ile<sup>4</sup>]-colloostatin significantly decreased the number of haemocytes circulating in the hemolymph of the *T. molitor* larvae, pupae and adults, effectively inhibited the cellular and humoral immune response and development of the ovary, reduced the number of eggs laid and impaired the hatchability of larvae from these eggs and the metamorphosis of the insect. Immunological studies allowed to identify four most effective immunoinhibitory analogues among the tested analogues, namely [Ala<sup>1</sup>]-, [Val<sup>1</sup>]-, [Hyp<sup>4</sup>]- and [Ach<sup>4</sup>]-colloostatin.

The second aim of the study was to investigate the possibility of introducing a natural peptide into the body of *T. molitor* by means of nanodiamonds (NDs). In the first stage of these studies, it was demonstrated that NDs penetrate through the insect cuticle to the haemocoel and then were phagocytosed by hemocytes and to a lesser extent accumulated in the cells of the insect's fat body. In the second stage of the study, it was shown that NDs did not affect the number of circulating haemocytes in the haemolymph, the phagocytosis of latex beads by hemocytes, the formation of nodules and the phenoloxidase activity in the experimentally infected insects, and did not interfere with the development of the ovary and the metamorphosis

of *T. molitor*. However, they caused a short-term delay in egg laying and reduced the hatchability of larvae from these eggs.

The third aim of the research was to introduce *Neb*-colloostatin and its most effective analogues ([Ala<sup>1</sup>]-, [Val<sup>1</sup>]-, [Hyp<sup>4</sup>]- and [Ach<sup>4</sup>]-colloostatin) using of NDs from the cuticle surface into the insect's body and induction of peptide-specific effects in the immune response, reproduction and development of the insect. It was shown that these peptides passed along with NDs from the cuticle surface into the insect haemolymph and effectively decreased the cellular and humoral immune response, strongly inhibited ovarian development, disrupted oogenesis and embryogenesis, and metamorphosis in *T. molitor*.

The results of these basic studies provided much new information on the effectiveness of the *Neb*-colloostatin analogues in insects. Among the tested analogues, four *Neb*-colloostatin analogues most effective in reducing the viability and number of insects were identified. Their molecules may undergo further chemical modifications, which may further increase their efficiency, and may become the subject of further research on the development of new bioinsecticides. The demonstration of the NDs penetration through the cuticle into the insect, their relatively high biocompatibility and the possibility of introducing active peptides into the insect with their help could contribute to increasing the overall understanding of effective routes for introducing bioactive particles into the insects, and developing of new methods of pest control.