

## Kitin sentez inhibitörü diflubenzuronun sivrisinek (*Culex pipiens*) larvalarının kütikulasına etkisinin belirlenmesi

### Determination of chitin synthesis inhibitor diflubenzuron's effect on the cuticle of mosquito (*Culex pipiens*) larvae

Mehmet Salih YIKILMAZ<sup>1</sup> (ID), Leyla YILDIZ<sup>1</sup> (ID), Gamze TURGAY İZZETOĞLU<sup>1</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** *Culex* cinsine ait dişi sivrisinek türleri hastalık taşınımı bakımından önemli bir bulaşıcı hastalık vektördür. Deri değişimi (ekdizis) sivrisinek gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Sivrisineklerde integüment tek tabakalı ektodermal hücrelerden ve bunların salgıladığı kütikül tabakasından meydana gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün larval mücadelede kullanılmak üzere tavsiye ettiği böcek büyüme düzenleyicileri (IGR) ve bazı biyoinsektisitler arasında diflubenzuron (DFB) ticari olarak en çok kullanılanlar arasındadır. DFB, böceklerde kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği için kitin sentez inhibitörü olarak tanımlanmıştır. DFB kitin sentezini inhibe ederek kütikül kompozisyonunu değiştirip, kitinin endokütikülda depolanması sırasında anomaliler oluşmasına ve deri değişiminin olması gerektiği şekilde gerçekleşmemesine sebep olmaktadır. Bu çalışmada, DFB uygulanmış üçüncü ve dördüncü evre sivrisinek (*Culex pipiens*) larvalarının kütikülalarında meydana gelen değişikliklerin, makro düzeyde ve histolojik olarak belirlenmesi ve olası anormalliklerin açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

#### ABSTRACT

**Objective:** Female mosquito species belonging to *Culex* sp. are important infectious disease vectors in terms of disease transmission. Ecdysis plays an important role in mosquito development. In mosquitoes, the integument consists of a single layer of ectodermal cells and the cuticle layer secreted by them. Among the insect growth regulators (IGR) and some bioinsecticides recommended by the World Health Organization for use in larval control, diflubenzuron (DFB) is among the most used commercially. DFB has been defined as a chitin synthesis inhibitor because it negatively affects cuticle formation in insects. DFB inhibits chitin synthesis, altering the composition of the cuticle and causing anomalies in the storage of chitin in the endocuticle, thereby preventing the proper occurrence of molting in the integument. In this study, it was aimed to determine the changes occurring in the cuticles of third and fourth instar mosquito (*Culex pipiens*) larvae treated with DFB at the macroscopic and histologic levels and to reveal possible abnormalities.

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Gamze TURGAY İZZETOĞLU  
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bornova / İzmir - Türkiye  
E-posta / E-mail : gamze.turgay@ege.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 29.03.2024  
Kabul Tarihi / Accepted : 11.07.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.89083

Yıkılmaz MS, Yıldız L, Turgay İzzetoğlu G. Kitin sentez inhibitörü diflubenzuronun sivrisinek (*Culex pipiens*) larvalarının kütikulasına etkisinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 41 - 52

**Yöntem:** Sivrisineklerle mücadelede en iyi sonuçlar larval mücadele ile alınmaktadır. Bu sebeple, *C. pipiens*'in üçüncü ve dördüncü larval evrelerinin bulunduğu su dolu kaba m<sup>2</sup>'ye 2,5 mg olacak şekilde DFB uygulanarak, 2-3 gün boyunca larvalardaki deri değiştirme davranışı takip edilmiştir. Aynı evrelere ait DFB uygulanmış (uygulama) ve uygulanmamış (kontrol) *C. pipiens* larvaları ayrıntılı bir şekilde karşılaştırılarak incelenmiş ve makroskopik olarak fotoğraflanmıştır. Ayrıca Bouin ile total olarak tespit edilen kontrol ve uygulama grubu sivrisinek larvaları rutin histolojik basamakların ardından 5-6 µm enine kesitler alınmıştır. Bu kesitlere Pollak's trikrom ve Heidenhain's Azan-Mallory boyama prosedürü uygulanarak preparatlar hazırlanmış ve detaylı incelemelerin ardından fotoğrafları çekilmiştir.

**Bulgular:** Uygulama yapılmış her iki evrenin de larvalarında makroskopik olarak şekil bozuklukları belirlenmiştir. Histolojik olarak da kütikülanın incelendiği ve hemen altında yer alan epidermal hücre tabakasının da altında yağ doku yığılmaları olduğu görülmüştür.

**Sonuç:** Sivrisineklerde büyüme esnasında meydana gelen deri değiştirme sürecinde, kitin sentez inhibitörlerinden biri olan DFB'nin kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği hem morfolojik hem de histolojik olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Culex pipiens*, diflubenzuron, histoloji, integüment, kitin sentez inhibitör, kütikula

**Methods:** The best results in mosquito control are obtained with larvae control. For this reason, DFB was applied at a rate of 2.5mg per m<sup>2</sup> to the water-filled container containing the third and fourth larval stages of *C. pipiens*, and to ecdysis behavior of the larvae followed for 2-3 days. DFB-treated and non-DFB-treated (control) *C. pipiens* larvae of the same stages were compared in detail, examined and macroscopically photographed. In addition, 5-6 µm cross-sections were taken from the control and treatment groups mosquito larvae, which were fixed as a total using Bouin fixative, following routine histological steps. Preparations were made by staining Pollak's trichrome and Heidenhain's Azan-Mallory process, then detailed observation and photographed.

**Results:** Macroscopic abnormalities were determined in the larvae of both treatment stages. Histologically, it was observed that the cuticle was thin and there were fat body accumulations under the epidermal cell layer just below it.

**Conclusion:** As a result, it has been determined both morphologically and histologically that DFB, one of the chitin synthesis inhibitors, negatively affects cuticle formation during ecdysis that occurs during growth in mosquitoes.

**Key Words:** *Culex pipiens*, diflubenzuron, histology, integument, chitin synthesis inhibitor, cuticle

## GİRİŞ

*Culex* cinsine ait dişi sivrisinek türleri hastalık taşıyıcı bakımından önemli bir bulaşıcı hastalık vektörüdür (1). Ayrıca arbovirüslerin vektörleri olarak *Lymphatic filariasis*'e (fil hastalığı) yol açan nematodlardan biri olan *Wucheria bancrofti* parazitinin, St. Louis, West Nile, Eastern equine, Venezuelian equine ve Japanese ensefalitleri ile Sindbis ateşi, Rift Valley ateşi hastalıklarına neden

olmaktadır (2-12). Sivrisineklerle mücadelede tür, gelişim safhası, uygulama alanı gibi bazı durumlar göz önünde bulundurulduğunda, en iyi sonuçlar larval mücadele ile alınmaktadır. Bunun yanında ergin mücadelesi de göz ardı edilemeyecek kadar kullanılan bir diğer yöntemdir (13). Sivrisineklerle mücadelenin önemli bir kısmını insektisitler oluşturmaktadır (14).

Dünya Sağlık Örgütü'nün larval mücadelede kullanılmak üzere tavsiye ettiği böcek büyüme düzenleyicileri (IGR) ve bazı biyoinsektisitler (15,

16) arasında diflubenzuron (DFB) ticari olarak en çok kullanılanlar arasındadır (17-19). DFB'nin böceklerde kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği belirlenmiş ve takip eden yıllarda böceklerdeki larvisidal ve ovisidal etkisi onaylanarak kitin sentez inhibitörü olarak tanımlanmıştır. DFB günümüze kadar birçok böcek türüyle mücadelede kullanılmaktadır. Mulla ve ark. (20), beş cins (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta* ve *Psarophora*) ve 16 tür sivrisinek larvasını DFB'ye maruz bıraktıktan sonra ergin oluşumunun engellendiğini belirlemişlerdir. DFB sivrisinek larvalarında çok düşük oranlarda (ppm ve ppb seviyesinde) bile etki göstermektedir. Ayrıca ortam koşullarına göre değişmekle birlikte suda 3-4 ay boyunca etkisinin sürdüğü bilinmektedir (19).

Deri değişimi sivrisinek gelişiminde önemli rol oynamaktadır (21). Sivrisineklerde integüment tek tabakalı ektodermal hücrelerden ve bunların salgıladığı kütikül tabakasından meydana gelir (21-23). Kütikül genellikle epikütikula, ekzokütikula ve endokütikula olmak üzere üç ayrı katmandan oluşur. Ekzo ve endokütikula bazen prokütikula olarak da adlandırılır. Son iki tabakadan herhangi biri indirgenebilir veya olmayabilir (24). Tüm epidermal hücreler, deri değiştirme esnasında kütikül modifikasyonu ve sindirilmesiyle ilişkili olan kütikül bileşenleri ve enzimleri salgırlar (23, 25).

Böceklerin büyümesi kütikül ile sınırlanmıştır. Böceğin büyümesine izin vermek için kütikül, eski kütikülün enzimler tarafından kısmen parçalanmasını ve yeni kütikülün biyosentezini içeren süreçler yoluyla deri değiştirme sırasında periyodik olarak atılmaktadır (26). Bu iki süreç sırasıyla apolizis ve ekdizis olarak bilinir. Ekdizisten sonra, yeni kütikül genişler ve kimyasal olarak modifiye edilir. Çoğu böcekte, yeni kütikülün yoğun birikimi deri değişim arası (intermolt) periyodu boyunca devam eder (23).

Ekdizis'in başlangıcında mitoz bölünme sonucunda hücre sayısı artar ve ekdizisi takip eden süre boyunca keskin, nispeten küçük bir düşüşe uğrar. Toplam hücre sayısında net bir artış vardır, bu sebeple birim alan başına sayı orijinal değerine

geri dönse de epidermin genel alanı ve dolayısıyla oluşturduğu kütikül artar (23,25). Deri değiştirmeyi takiben besleme döneminde, hücrelerin üzerindeki kütikül ortaya çıktıkça ve hücreler yana doğru yayıldığında hücre yoğunluğu azalır. Daha sonra, mitoz gerçekleştiğinde ve hücre sayısı arttığında, hücre yoğunluğu keskin bir şekilde artar. Larval-pupal deri değiştirmede, larva pupaya dönüşürken boyunun kısalması ve hücrelerin yeniden düzenlenmesinden dolayı yoğunlukta bir miktar artış meydana gelebilir. Epidermal hücre yoğunluğunda meydana gelen bu değişikliklerle birlikte hücre şekillerinin değişmesi de gerçekleşir (23). Ekdizis hemolenf basıncının artması sonucunda, eski kütikülün kalıntılarının dorsal hat boyunca çatlaması ile meydana gelir. Ayrılan kütikula, eski epikütikula ve ekzokütikulanın sindirilemeyen protein, lipid ve kitinlerini içerir. Yeni deri değiştirmiş olan bir böcek, eski deri sınırlamasından kurtulduğunda, yeni kütikulasını genişletir. Bu olay, kırışmış ve katlanmış epikütikulanın düzeltilmesi, prokütikulanın gerilmesi amacıyla vücudun farklı bölgelerinde hemolenf basıncının artması veya su alınımıyla gerçekleşir (27).

Hücre şeklindeki değişikliklerin bir sonucu olarak, epidermal hücre yüzeyinde gerilme meydana gelir ve bu da epidermal hücrelerin kütikülden ayrılmasına neden olur. Bu olaya apolizis denir (23).

DFB, benzoil üre ailesinden böcek büyüme düzenleyicisi olarak sınıflandırılmaktadır. Hedef organizmaların dış iskeletinin oluşumunu ve larva büyümesini kesintiye uğratan seçici olmayan kitin sentezi inhibitörüdür (1). DFB kitin sentezini inhibe ederek kütikül kompozisyonunu değiştirir. Böylece kitinin endokütikulada depolanmasında anomaliler oluşur ve deri değişimi olması gerektiği şekliyle gerçekleşmez. Sivrisineklerde, larva deri değiştirirken meydana gelen yeni kütikula şeffaflaşır. Bazı durumlarda kütikula yer yer yarılıp parçalanır. Bazı durumlarda yeni deri tam olarak oluşturulamaz ve eski deri de atılmaz. Böylece hem eski deri katmanlarının hem de yeni deri katmanlarına sahip larva veya pupalar gözlenir (28-30).

Bu çalışmanın amacı, bir kitin sentez inhibitörü olan DFB uygulanmış üçüncü ve dördüncü evre sivrisinek (*C. pipiens*) larvalarında kütikülada meydana gelen değişikliklerin, makro düzeyde ve histolojik olarak belirlenmesi ve olası anormalliklerin açığa çıkarılmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hayvan Eldesi ve Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan *C. pipiens* üçüncü ve dördüncü evre larvaları, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Egemikal Analiz Laboratuvarı Haşere Grubu Biyolojik Etkinlik Laboratuvarı'ndaki kültürlerden 01.05.2023-10.05.2023 tarihleri arasında temin edilmiştir. Larvalar gelişimlerini devam ettirebilmeleri ve besleyici olması nedeniyle öğütülmüş tavuk ciğeriyle, erginler ise %10'luk şekerli suyla beslenmiştir. Sivrisineklerin gelişimlerinin normal bir şekilde devam etmesi için, laboratuvar koşulları bütün yetiştirme süreci boyunca 25 °C sıcaklıkta, %65-70 nemde, 12 saat gündüz/12 saat gece olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Laboratuvar ortamında kültürü yapılan sivrisinek popülasyonlarının, küçük su dolu bir kaba bıraktığı yumurtalar dikkat bir şekilde 15cmx25cmx5cm boyutlarındaki kaplara alınmıştır. Açılan yumurtalardan çıkan larvalar öğütülmüş tavuk ciğeriyle beslenmiştir. Üçüncü larval evreye ulaşan sivrisinekler kontrol ve uygulama grubu olacak şekilde iki farklı kaba alınmıştır. Aynı işlem dördüncü larval evre için de tekrarlanmıştır.

### Diflubenzuron (DFB) Uygulanması

*Culex pipiens*'in üçüncü ve dördüncü larval evrelerini bulunduğu su dolu kaba m<sup>2</sup>'ye 2.5 mg olacak şekilde DFB uygulanmıştır. 2-3 gün boyunca larval evrelerde deri değiştirme davranışı olup olmadığı takip edilmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırmalar yapılarak makro düzeydeki farklar belirlenmiştir. Bu aşamada kontrol grupları (üçüncü evre larvalar için 10 adet, dördüncü evre larvalar için 10 adet) ile üçüncü evre (10 adet) ve dördüncü evre (10 adet) uygulama gruplarından olmak üzere toplamda 40 adet alınan

örnekler histolojik durumları belirlenmek üzere bouin tespit solüsyonunda fikse edilmiştir.

### Morfolojik İnceleme

Kontrol ve uygulama grubu sivrisinek *C. pipiens* üçüncü ve dördüncü larval evreleri Olympus marka stereomikroskop altında ayrıntılı bir şekilde incelenmiş, makroskobik fotoğrafları Kameram dijital görüntü analiz yazılımı kullanılarak çekilmiştir.

### Histolojik İnceleme

Bouin (doymuş pikrik asit 75mL, %40'luk formaldehit 25mL, asetik asit 5mL) ile 24 saat boyunca tespit edilen kontrol ve uygulama grubu sivrisinek *C. pipiens*'ler %70'lik alkol ile bouinin etkisi örneklerden uzaklaşana kadar yıkama yapılmıştır. Sonra konsantrasyonları artan alkol serilerinde tutulan örneklerden mevcut suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra örneklerden hem alkolün giderilmesi hem de gömme ortamı olarak kullanılacak olan parafinle uyum sağlaması bakımından kontrollü bir şekilde örnekler ksilolde tutulmuştur. Parafine gömme işleminin ardından mikrotom adı verilen cihazlar yardımıyla 5-6 µm enine kesitler alınarak, önce kesitlere obje çevresinde bulunan parafinin giderilmesi için ksilol uygulaması sonra da konsantrasyonları azalan alkol serilerine tabii tutularak boyamaya hazırlık aşamaları tamamlanmıştır. Çalışmayı oluşturan yapılarda detayı görme amacıyla kesitlere Pollak's trikrom boyama prosedürü ve Heidenhain'in Azan-Mallory boyama prosedürü (31, 32) yöntemleri aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

**Pollak's Boyama Prosedürü (31,32):** Rutin basamakların tamamlanmasından sonra Mayer'in Hematoksileni'nde beş dakika bekletilmiştir. Çeşme suyunda mavileşene kadar yıkama yapılmıştır. Saf sudan geçirilmiştir. Sonra Trikrom boyasında 7 dk tutulmuştur. Saf su ile çalkalanmıştır. Boyaları sabitleme amaçlı birkaç saniye saf su ile hazırlanmış %0,2'lik asetik asitte bekletilmiştir.

**Azan Stain, Mallory Heidenhain's boyama prosedürü (31, 32):** Azokarmin'de 1 buçuk saat bekletilmiştir. Ardından saf su ile çalkalanmıştır.

Boyanın fazlalığı anilin alkol ile uzaklaştırılmıştır. Boyayı sabitleme amaçlı 1-2 dk %96 alkol ile hazırlanmış %1'lik asetik asitte tutulmuştur. Bu işlemde sonra fosfotungstik asitte 3,5 saat bekletildikten sonra saf su ile çalkalanıp anilin mavisinde 3 saat bekletilmiştir. Fosfotungstik asitte tekrar 4 dk bekletildikten sonra 1-2 dk saf su ile hazırlanmış %1'lik asetik asitte bırakılmıştır.

Son olarak ayrı ayrı uygulanan her iki boyamanın ardından dehidrasyon amacıyla konsantrasyonları artan alkol serilerinden ve ardından alkolün tamamen giderilmesi ve kapatıcı kimyasal olan entellan ile uyum sağlanması için ksilolde bekletilen preparatlar sırasıyla lamel kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmişlerdir. Preparatlar mikroskopta

gözlemlenmiş ve ZEN görüntü analiz yazılımı kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

## BULGULAR

### Morfolojik Bulgular

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DFB uygulanmış *C. pipiens*'in üçüncü evre larvalarında morfolojik olarak şekil bozuklukları görülmüştür. Bunlar; baş, toraks, sifon ve anal papilla kısmında kararmalar ile toraks kısmında kütikülanın birikmesiyle oluşan kırışıklıklar (Şekil 1. A-B), toraks ile baş kısmının bağlantı yaptığı bölgede uzama, toraksta kararmalar, abdomen kısmında yer yer şeffaflaşmalar gözlemlenmiştir (Şekil 1. A-C).



Şekil 1. Üçüncü evre *Culex pipiens* larvalarında DFB'nin morfolojik etkileri.

A. Kontrol grubu, B, C. DFB uygulanmış grup. ab; abdomen, ap; anal papilla, b; baş, s; sifon t; toraks.

Kontrol grubuna göre; DFB uygulanmış *C. pipiens*'in dördüncü evre larvalarında baş, toraks, anal papilla ve sifon kısımlarında kararmalar (Şekil 2. B-C-D), larvaların toraks kısmında şeffaflaşma (Şekil 2. C) ve toraksın dorsal kısmında yırtılmalar (Şekil

2. D) şeklinde morfolojik bozukluklar belirlenmiştir. Ayrıca, üçüncü ve dördüncü larval evrede DFB uygulanmış gruplardaki bireylerin hiçbiri gerektiği gibi deri değiştirip pupa aşamasına geçememiştir.





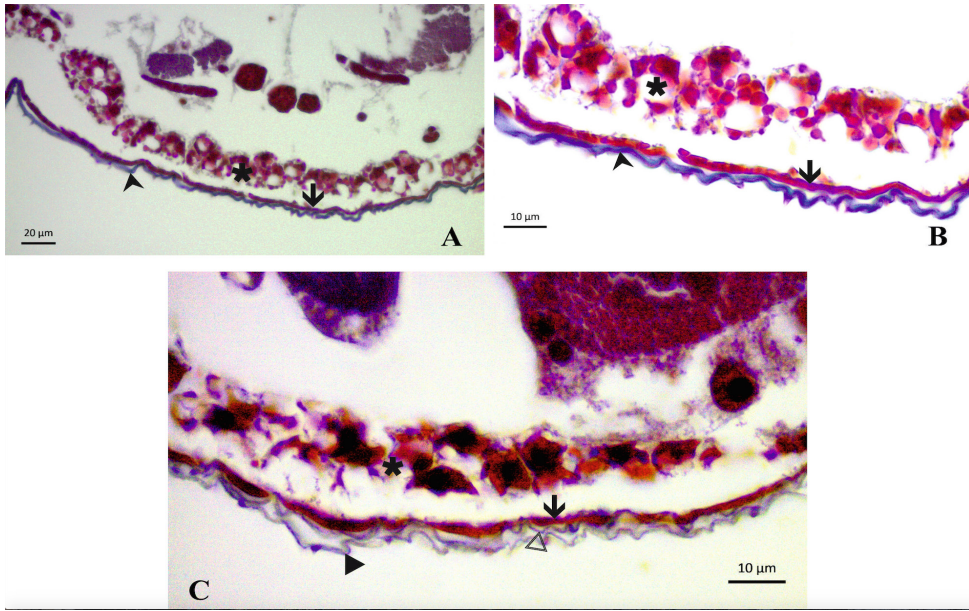
**Şekil 2.** Dördüncü evre *Culex pipiens* larvalarında DFB'nin morfolojik etkileri.

A. Kontrol grubu, B, C. DFB uygulanmış grup. ab; abdomen, ap; anal papilla, b; baş, s; sifon, t; toraks.

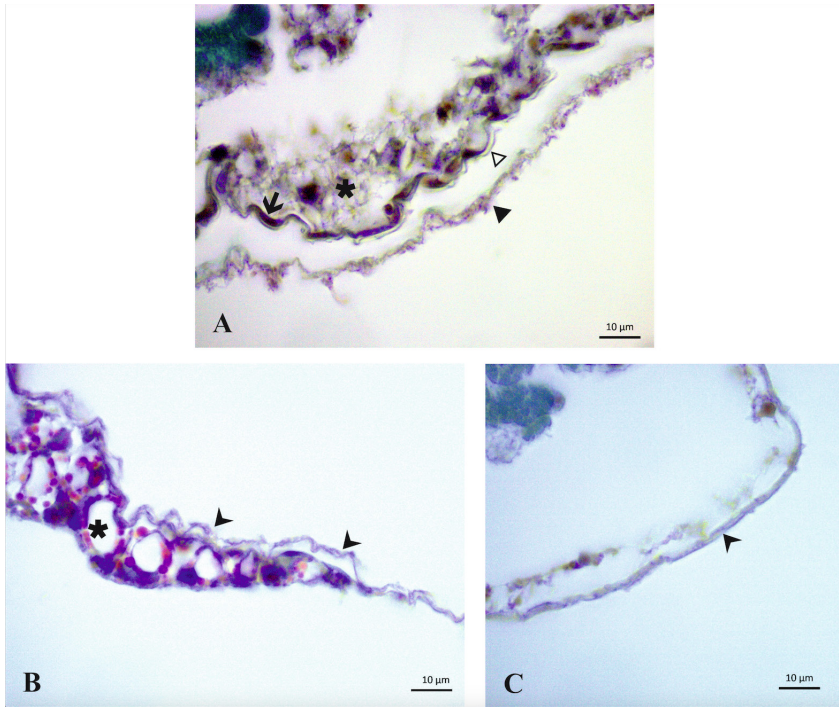
### Histolojik Bulgular

Üçüncü larval evreye ait kontrol grubu *C. pipiens*'lerden alınan enine kesitlerde kütiküla altında tek sıra epidermal hücre tabakası yer almıştır (Şekil 3. C ve 4. A). Hücre tabakası, alt kısımda yer alan yağ doku ile ilişkilidir (Şekil 3. C ve 4. A). Ayrıca epidermal hücre nükleusları da net bir şekilde gözükmekte ve deri değiştirme esnasında meydana gelen ve daha da ilerlemiş apoliz olarak

düşündüğümüz aşama gözlenmiştir (Şekil 4 A). Eski kütiküla, yeni oluşmakta olan kütiküladan tam olarak ayrılmamakla birlikte, birbirlerine yakın yer almıştır (Şekil 3. C). DFB uygulaması sonrasında bu evre larvaların kontrol grubuna göre kütikulasının kompakt yapısının bozulduğu ve gevşediğini (Şekil 4. B), ayrıca yok denecek kadar incelendiğini söylemek mümkündür (Şekil 4. B-C).



**Şekil 3.** Kontrol grubu *Culex pipiens* üçüncü ve dördüncü larval evrelerinin kütiküla tabakasının histolojisi. A. Dördüncü larval evre, B. Dördüncü larval evre, C. Üçüncü larval evre (boya: Heidenhain's Azan-Mallory).  
 ↓; epidermal hücreler, ▲; kütiküla, ►; eski kütiküla, ◁; yeni kütiküla, \*; yağ doku.



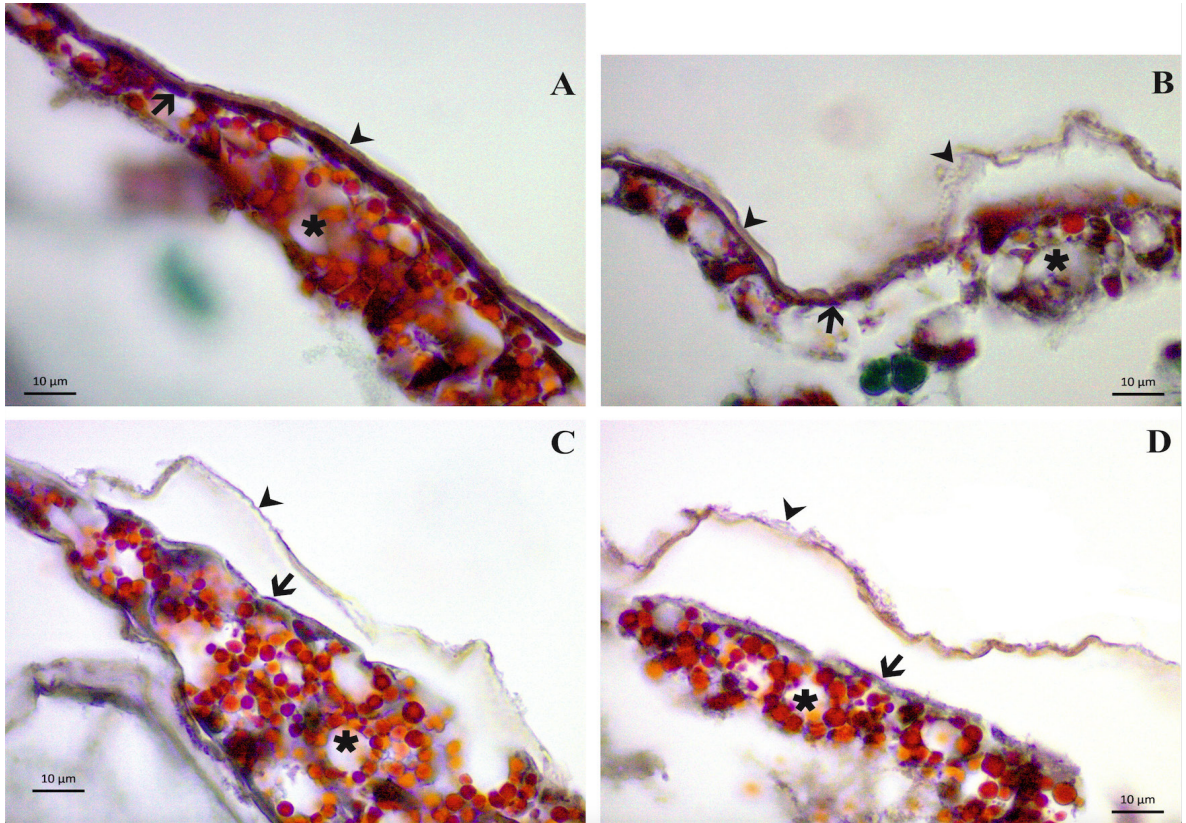
**Şekil 4.** *Culex pipiens* üçüncü larval evrelerinin kütiküla tabakasının histolojisi. A. Kontrol grubu, B, C. DFB uygulanmış grup (boya: Pollak's trikrom).  
 ↓; epidermal hücreler, ▲; kütiküla, ►; eski kütiküla, ◁; yeni kütiküla, \*; yağ doku.



Dördüncü larval evreye ait kontrol grubu *C. pipiens*'lerden alınan enine kesitlerde kütiküla Azan Stain, Mallory Heidenhain's boyası mavi-mor renklerinde boyanmıştır (Şekil 3. A-B). Kütikülanın hemen altında üçüncü larval evrede olduğu gibi epidermal hücre tabakası yer almakta (Şekil 3. A-B) ve yine kütiküla çok ince olduğu için histolojik düzeyde tabakalanmalar net bir şekilde ayırt edilememiştir. Epidermal hücre tabakasının altında yağ doku yığılmaları gözükmiştir (Şekil 3. A-B ve 5. A). DFB uygulanmış dördüncü evre larvaların enine kesitlerinin bazılarında kütikülanın kompakt

yapısı kaybolmuş ve epidermal hücrelerle bağlantısı kopmuştur (Şekil 5. B-C-D). Kütikülanın kontrol grubuna göre incelendiği DFB uygulanmış gruplarda net olarak görülmüştür (Şekil 5. B-C-D).

Üçüncü ve dördüncü larval evre kontrol grubundan alınan enine kesitler karşılaştırıldığında gelişime bağlı olarak, üçüncü larval evre kütikülasının (Şekil 6. C-D), dördüncü larval evre kütikülasına (Şekil 6. A-B) göre ince olduğu gözlemlenmiştir. Kütikülanın en dışında, yer yer koyu mavi hat halinde epikütiküla tabakası gözüküştür (Şekil 6. B). Epidermal hücreler yağ doku ile ilişkili görülmüştür (Şekil 6).

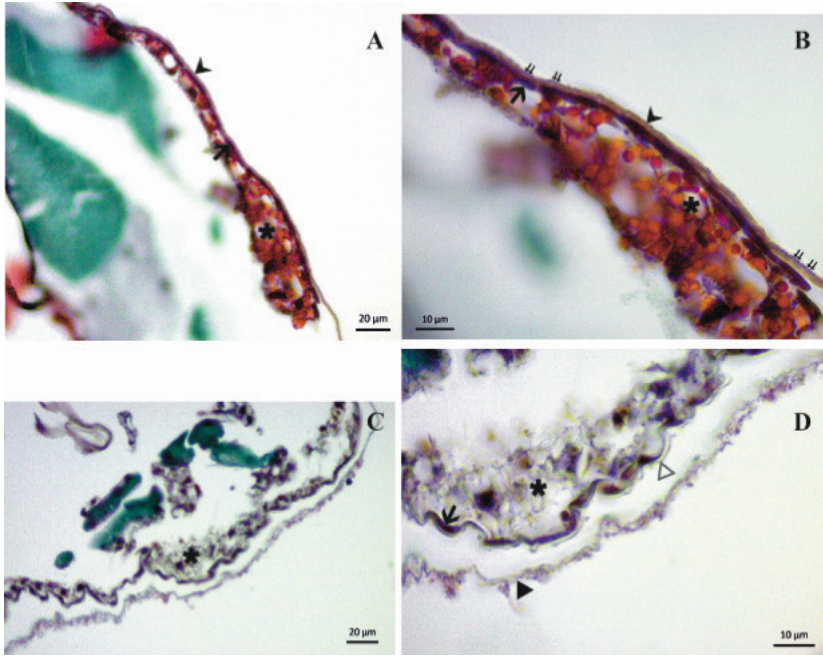


**Şekil 5.** *Culex pipiens* dördüncü larval evrelerinin kütiküla tabakasının histolojisi.

A. Kontrol grubu. B, C, D. DFB uygulanmış grup (boya: Pollak's trikrom).

▼; epidermal hücreler, ▲; kütiküla, \*; yağ doku.





Şekil 6. Kontrol grubu *Culex pipiens* üçüncü ve dördüncü larval evrelerinin kütikula tabakasının histolojisi.

A, B. Dördüncü larval evre, C, D. Üçüncü larval evre (boya: Pollak's trikrom).

↘; epidermal hücreler, ∥; epikütikula, ▲; kütikula, ►; eski kütikula, <◁; yeni kütikula, \*; yağ doku

## TARTIŞMA

Birçok temel entomoloji kitabında böcek kütikulası ve tabakaları ayrıntılı şekilde verilmiştir (21-23). Ancak örnek olarak verilen böcekler daha çok karasal olup, genellikle kütikula tabakası kalındır. Ayrıca sivrisineklerle karşılaştırıldıklarında epey büyük hayvanlar oldukları gözden önünde bulundurulmalıdır. Sivrisinek larvaları sucul canlılardır ve oldukça narin böceklerdir. Ayrıca sifonlarının yanı sıra deri solunumu da yaptıkları bilinmektedir (33). Bu nedenle alınan histolojik kesitlerde kütikül tabakalarının net bir şekilde ayırt edilememesi normal karşılanmalıdır. Kütikül tabakasının tamamının yer yer 1 µm'den bile ince olduğu görülmektedir.

Özellikle dördüncü evre larvalarda kütikulayı oluşturan epidermal hücrelerin yağ doku ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu da yağ dokuda da depolanan protein, karbonhidrat ve yağların kütikül oluşumunda bir şekilde kullanıldıklarını düşündürmüştür.

DFB uygulanmış larvaların genel görüntüleri Khater (34)'in sonuçlarıyla uyum göstermiştir. Larvalardaki genel şekil bozuklukları, baş-abdomen ve torakstaki kararmalar benzerdir. Bazı larvalarda kütikülada gözlenen şeffaflaşmalar da yeterince kitin sentezi yapılmadığına işaret etmiştir. Üçüncü evre larvada toraksta gözlenen kütikül kırışıklıkları apolizis olayının gerçekleştiğini, ancak ekdizis olayının tam olarak gerçekleşemediğini, yani eski kütikulanın atılmadığını ve bu nedenle söz konusu kırışıklıkların oluştuğu düşünülmüştür (Şekil 1.B). Bazı örneklerde gözlenen şeffaflaşmalar ise kitin sentezinin yeterince yapılmadığını ve eski kütikulanın apolizise uğradıktan sonra incilmesi ile ışık geçirgenliğinin arttığını ve mikroskop altında şeffaf bir görüntü oluştuğu yönündedir. Özellikle dördüncü evre bazı larvalarda toraks kısmında kütikulanın yarılması, bu evrede bir miktar kitin sentezlendiğini ve apolizisin gerçekleştiğini ancak ekdizis olayının tam anlamıyla meydana gelmediğini ve toraksta bir ayrılma olduktan

sonra ekdizisin kesintiye uğradığı tahmin edilmiştir.

Histolojik kesitlerde DFB'nin etkisini çok net görmek mümkün olmamıştır. Ancak bazı işaretler dolaylı olarak etkinin belirlenmesinde yardımcı olmuştur. Sivrisinek larvasının kütikülası zaten çok incedir. Etkinin belirgin biçimde görülmesi ışık mikroskobu aşamasında oldukça zordur. Buna rağmen gevşemiş, epidermal hücrelerle bağlantısı kopmuş ve görece incelmış kütiküla etkinin yorumlanması aşamasında yardımcı olmuştur. Ancak daha net yorumlarda bulunabilmek için elektron mikroskobu teknikleriyle daha detaylı incelemeler yapmak yerinde olacaktır.

Bu çalışmayla, sivrisineklerde büyüme esnasında meydana gelen deri değiştirme sürecinde, kitin sentez inhibitörlerinden biri olan DFB'nin kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği belirlenmiştir. DFB halk sağlığına yönelik sivrisinek ve ev sineği (=karasinek) larvalarının kontrolünün yanında birçok tarım zararlısının kontrolünde de kullanılmaktadır (17-19). DFB, sivrisinek larvalarına karşı Avrupa'da mevcut olan çok az aktif içerikten biri olduğundan,

DFB direnci *C. pipiens* kontrolü için büyük önem taşımaktadır (35). DFB'nin kitin sentezini tam olarak nasıl inhibe ettiği kesin olarak açıklanamamıştır (18, 28). DFB sivrisinek larvalarıyla mücadele için uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmıştır. Bu süreçte içme sularında da birikme gözlenmiştir. Etki mekanizmasının tam olarak açıklanamaması dolayısıyla insan sağlığında oluşturması muhtemel etkileri ön görülememektedir. Bu nedenle T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2018'den itibaren sivrisinekle mücadelede kullanılması yasaklanmıştır.

Sonuç olarak; DFB sivrisinek larvalarıyla mücadelede çok düşük miktarlarda bile etki gösterebilen bir sentetik maddedir. Bu maddenin başka eklem bacaklıların bulunmadığı su kütlelerinde kullanımı faydalı olabilmektedir. Ayrıca omurgalılara zarar vermemesi DFB'yi kullanıma uygun bir ürün haline getirmektedir. Etki mekanizmasının aydınlatılması DFB'yi potansiyel tehlike olmaktan çıkaracak ve kullanımı tekrar gündeme gelecektir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Pešić B, Kulišić Z, Teodorović R, Trailović SM, Djokić V, Djordjevic M. Comparison of mosquito larvicidal formulations of diflubenzuron on *Culex pipiens* mosquitoes in Belgrade, Serbia. *Acta Vet*, 2022; 72(1): 87-99.
2. Nazni WA, Lee HL, Azahari AH. Adult and larval insecticide susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquitoes in Kuala Lumpur Malaysia. *Trop Biomed*, 2005; 22(1): 63-8.
3. Hardstone MC, Leichter C, Harrington LC, Kasai S, Tomita T, Scott JG. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance confers limited and larval specific cross-resistance in the southern house mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Pestic Biochem Physiol*, 2007; 89(3): 175-84.
4. Norris LC, Norris DE. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes after the introduction of insecticide-treated bed nets in Macha, Zambia. *J Vector Ecol*, 2011; 36(2): 411-20.
5. Becker N, Jöst A, Weitzel T. The *Culex pipiens* complex in Europe. *J Am Mosq Control Assoc*, 2012; 28(4): 53-67.
6. Zhao M, Dong Y, Ran X, Guo X, Xing D, Zhang Y, et al. Sodium channel point mutations associated with pyrethroid resistance in Chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*, 2014; 7: 369.
7. Scott JG, Yoshimizu MH, Kasai S. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol*, 2015; 120: 68-76.
8. Shi L, Hu H, Ma K, Zhou D, Yu J, Zhong D, et al. Development of resistance to pyrethroid in *Culex pipiens pallens* population under different insecticide selection pressures. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015; 9(8): e0003928.
9. Yanola J, Chamnanya S, Lumjuan N, Somboon P. Insecticides resistance in the *Culex quinquefasciatus* populations from northern Thailand and possible resistance mechanisms. *Acta Trop*, 2015; 149: 232-8.
10. Yuan JZ, Li QF, Huang JB, Gao JF. Effect of chlorfenapyr on cypermethrin-resistant *Culex pipiens pallens* Coq mosquitoes. *Acta Trop*, 2015; 143: 13-7.
11. Taskin BG, Dogaroglu T, Kilic S, Dogac E, Taskin V. Seasonal Dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. *Pestic Biochem Physiol*, 2016; 129: 14-27.
12. Uyar Y, Bakır E. Batı Nil Virüsü (BNV) ve Türkiye’de Batı Nil Virüsü’nün güncel durumu. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2016; 73(3): 279-92.
13. Zhu F, Lavine L, O’Neal S, Lavine M, Foss C, Walsh D. Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects*, 2016; 7(1): 2.
14. Capinera JL. *Encyclopedia of Entomology*. 2nd ed. New York: Springer. 2008.
15. Nauen R. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci*, 2007; 63(7): 628-633.
16. Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2012.
17. Stenersen J. *Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology*, 1st ed, USA: CRC Press. 2004.
18. Perry AS, Yamamoto I, Ishaaya I, Perry R. *Insecticides In Agriculture and Environment Retrospects and Prospects*, Berlin: Springer. 1998.
19. Dhadialla TS. *Advances in insect physiology*, 1st ed, Academic Press Elsevier, 2012.
20. Mulla MS, Norland RL, Ikeshoji T, Kramer WL. Insect growth regulators for the control of aquatic midges. *J Econ Entomol*, 67 (2): 165-70.
21. Gillot C. *Entomology*. 3rd ed. Springer. 2005.

22. Clements AN. The Biology of Mosquitoes. Vol 1. London: CABI Publishing. 2000.
23. Chapman RF. The Insects: Structure and function, 5th ed, Cambridge University Press, New York, 2013.
24. Nation JL. Insect physiology and biochemistry, 3rd ed, CRC Press, 2015.
25. Gilbert L. Insect Endocrinology, 1st ed, Elsevier, 2012.
26. Montaña-Reyes A, Llanderal-Cázares C, Valdez-Carrasco J, Miranda-Perkins K, Sánchez-Arroyo H. Susceptibility and alterations by diflubenzuron in larvae of *Aedes aegypti*. Arch Insect Biochem Physiol, 2019; 102 (2): e21604.
27. Gullan PJ, Cranston PS. The Insects: An outline of entomology, 5th ed, Wiley-Blackwell, 2014.
28. Ishaaya I. Biochemical sites of insecticide action and resistance, 1st ed, Springer, 2001.
29. Emden HF, Service MW. Pest and vector control, Cambridge University Press, 2004.
30. Perveen F. Insecticides Advances in integrated pest management, 1st ed, InTech, Croatia, 2011.
31. Humason GL. Animal tissue techniques, United States of America, 1962.
32. Öber A. Zoolojide laboratuvar teknikleri, 3. baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, No: 183, İzmir, 2009.
33. Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, et al. Mosquitoes and their control, 2nd ed, Springer, 2010.
34. Khater HF. Biocontrol of some insects. PhD Thesis, Zagazig University, Benha Branch, Egypt. 2003.
35. Mastrantonio V, Porretta D, Lucchesi V, Güz N, Çağatay NS, Bellini R, et al. Evolution of adaptive variation in the mosquito *Culex pipiens*: Multiple independent origins of insecticide resistance mutations. Insects, 2021; 12 (8): 676.