

## QUANTITATIVE AND STRUCTURAL CHANGES OF TESTIS AND SEMEN QUALITY PARAMETERS CHANGES CAUSED BY PERORAL ADMINISTRATION OF DIAZINON IN RATS

*Michal Cabaj, Róbert Toman, Mária Adamkovičová, Peter Massányi, Branislav Šiška,  
Norbert Lukáč, Jozef Golian, Svätoslav Hluchý*

### ABSTRACT

The aim of this study was to find the quantitative and structural changes in the rat testis and changes of semen quality after a diazinon administration. **METHODS:** Rats received diazinon (99% purity) in their drinking water ( $40 \text{ mg.l}^{-1}$ ) with free access. Age of rats at the beginning of the experiment was 30 days and experiment lasted for next 90 days. The histological samples were evaluated by histological and morphometric methods in light microscopy and the samples of semen were evaluated with CASA method. **RESULTS:** Disintegration of cellular associations in the seminiferous epithelium, germ cells evacuation into the tubule lumen and their necrosis were mostly observed. Rarely vacuolisation and cracks of epithelium and fibrotisation of interstitial tissue were noted. Morphometric methods have shown extension of epithelium ( $P < 0,01$ ), reduction of tubule lumen ( $P < 0,001$ ) and dilatation of blood vessels ( $P < 0,001$ ). In CASA analysis elevation of all parameters were noted, with statistically significant increase of DSL, VSL, ALH. Dilatation of blood vessels will be probably one of the most significant finding in diazinon toxicity because changes in blood flow in the testis are the key factors of accurate physiological function of testis. The epithelium despite the serious disintegration of germ cells associations and release of these necrotised germ cells to the lumen was significantly extended. This fact indicates the self-reparation compensational function. The same tendency (stimulation effects) has been found in all analysed sperm parameters. It supports previous hypothesis. **CONCLUSIONS:** Diazinon in this design of experiment causes the disintegration of the germinal epithelium cells associations consequently leading to necrosis and release of these cells to the tubule lumen. Dilatation of blood vessels and unknown stimulation effect on sperm quality parameters are two other common effects of diazinon. We concluded that diazinon in our subchronic low dose test causes middle to moderate histological, morphometric and semen quality changes which were partially compensated with some unknown recovery mechanism. Otherwise, subcellular structures and their functions may be damaged which can lead to subfertility. Further investigation of diazinon is needed for verification of our hypothesis.

**Keywords:** diazinon, testis, histology, morphometry, sperm, rat

### ÚVOD

Diazinon je pesticíd určený na reguláciu rozmanitého hmyzu patriaci do skupiny organofosforečných pesticídov používaných v poľnohospodárstve, veterinárnej medicíne a domácnostiach. Ak sa v danej oblasti používa, je vďaka rozmanitým spôsobom použitia v životnom prostredí všadeprítomný kontaminant, od stopových až po potenciálne toxické koncentrácie pre živé zložky ekosystému (Swan, 2006; Swan et al., 2003; Roelveld et al., 2008; Jurewicz et al., 2009; ATSDR, 2008). Ľahko preniká do vôd, pôdy a vo forme aerosólu môže byť roznášaný vetrom. Do organizmu preniká cez všetky známe cesty expozície. Je extrémne toxický pre ryby a vodné živočíchy, vtáky a včely, pre cicavce je stredne toxický (Inchem, 2012). Pri nedodržaní správnych ochranných lehôt, alebo dávok pri postrekoch plodín, či sádov, alebo pri manipulácii, či aplikácii, vzniká potenciálne riziko pre pracovníkov (Rastogi et al., 2009; Swan, 2006; Recio-Vega et al., 2008), ľudí žijúcich v aplikačnej oblasti (Swan et al., 2003; Swan, 2006; Roelveld et al., 2008; Jurewicz et al., 2009), alebo

konzumenta finálneho produktu (ATSDR, 2008; RASFF, 2012). Rýchlym výstražným systémom pre potraviny a krmivá (Rapid Alert System for Food and Feed) boli v posledných desiatich rokoch raz až niekoľkokrát ročne zachytávané na obchodný trh určené dodávky ovocia, zeleniny a poľných plodín kontaminované diazinonom z rozmanitých krajín sveta (RASFF, 2012). Diazinon ako látka s vysokým toxickým potenciálom vplyva cieľovo na mnohé orgánové systémy (ATSDR, 2008; Yehia et al., 2007; Wecker et al., 1985; Kashanian et al., 2008; Maxwell a Dutta, 2005; Alahyary et al., 2008; Oostingh et al., 2009; Kojima et al., 1993) najznámejšie sú jeho neurotoxické účinky (Roegge er et al., 2008; Rush et al., 2010; Slotkin a Seidler, 2007; Slotkin a Seidler, 2009). Jedným z ďalších cieľových systémov, na ktorý vplyva, je aj samčí reprodukčný systém (Abd el-Aziz, Shalab, Abd El-Khalik, 1994; Swan, 2006; Swan et al., 2003; Piña-Guzmán, Solís-Heredia, Quintanilla-Vega, 2005; Okamura et al., 2009; Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón, 2009a,b; Recio-Vega et al., 2008). Cieľom experimentu bolo simulovať perorálnu subchronickú

expozíciu diazinonom a popísať a vyhodnotiť prípadné histologické a morfometrické zmeny semenníka a parametre pohyblivosti spermií potkana, ako časť extrapoláčného toxikologického modelu – odhadu toxikologického rizika u človeka na základe účinkov zaznamenaných pri skúmaní na zvieratách.

### MATERIÁL A METÓDY

20 samcov potkanov línie Wistar bolo náhodne rozdelených do dvoch skupín po 10 nasledovne: kontrolná skupina a skupina s opakovaným perorálnym podávaním diazinonu. Vek zvierat v oboch skupinách pri začiatku experimentu bol 30 dní. Samcom experimentálnej skupiny sa podával diazinon (Sigma-Aldrich, USA; 99% čistota) v pitnej vode, v koncentrácii 40 mg.l<sup>-1</sup> počas 90 dní. Na konci experimentu boli samci oboch skupín anestetizovaní (parami éteru) a humane usmrtení. Po usmrtení sa vykonala anatomická pitva a odobrali sa vzorky semenníkov, ktoré sa fixovali v modifikovanom Davidsonovom roztoku (Latendresse et al., 2002). Zvieratá boli umiestnené individuálne v plastových nádobách na podstielke z drevených hoblín. V priestoroch pokusného zariadenia sa dodržiavali základné nároky na životné podmienky (teplota 20 – 22 °C, vlhkosť 55 ± 10 %, 12 hodinový svetelný režim) a neobmedzený prístup k vode a krmivu (M3, Máchal, Česká republika) podľa nariadenia vlády SR č. 289/2003 Z.z.. Experimenty sa vykonávali v schválenom pokusnom zariadení SK PC 50004 SPU v Nitre.

#### *Histologické a morfometrické hodnotenie*

Vzorky semenníka sa farbili hematoxylin-eozínom a skúmali sa v svetelnom mikroskope Nikon Eclipse E600. Hodnotenie mikrofotografií bolo uskutočnené komputerizovaným systémom vyhodnocovania pomocou PC morfometrického software M.I.S. Quick Photo a mikroskopom Olympus AX 70. Vzorky semenníkov na histologických preparátoch sa ďalej vyhodnotili kvantitatívnymi morfometrickými metódami modifikovanými podľa **Uhrína a Kulíšeka (1980)**. V semenníku sa hodnotil absolútny objem štruktúry semenníka (μm<sup>3</sup>) pre: semenotvorný epitel, lúmen semenotvorných kanálikov, prázdne miesta v semenotvornom epiteli, intersticiálne tkanivo, krvné cievy; ďalej sa hodnotil priemer (μm) a plocha semenotvorného kanálika (μm<sup>2</sup>). Porovnávaná bola tiež priemerná hmotnosť semenníka (g).

#### *Hodnotenie parametrov kvality ejakulátu*

Prisemenník bol odobratý pri anatomickej pitve, ihneď po usmrtení zvierat. Z prisemenníka bola odobratá vzorka ejakulátu. Vzorky boli nariadené fyziologickým roztokom (20 μl) neustále udržiavané pri teplote 37 °C. Vzorka bola umiestnená na 10 μm hlbokú Maklerovu komôrku (Sefi-Medical Instruments, Israel) a následne bolo hodnotených minimálne 8 reprezentatívnych zorných polí. Vo vzorkách ejakulátu získaného z prisemenníka sa systémom CASA SpermVision (Minitüb, Tiefenbach, Germany) za pomoci mikroskopu Olympus BX 51 (Olympus, Japan) hodnotili nasledovné parametre spermií:

- % pohyblivých spermií
- % progresívne pohyblivých spermií

- DAP - distance average path; priemerná dráhová vzdialenosť (μm)
- DCL - distance curved line; línia zaoblenej vzdialenosti
- DSL - distance straight line; línia priamej vzdialenosti
- VAP - velocity average path; priemerná dráhová rýchlosť (μm/s)
- VCL - velocity curved line; rýchlosť v zaoblenej línii
- VSL - velocity straight line; rýchlosť v priamej línii
- STR - straightness; priamosť pohybu (VSL/VAP)
- LIN - linearita (VSL/VCL)
- WOB - wobble; kmitanie (VAP/VCL)
- ALH - amplitude of lateral head displacement; amplitúda laterálneho premiestnenia hlavičky (μm.s<sup>-1</sup>)
- BCF - beat cross frequency; frekvencie krížneho úderu (Hz)

#### *Štatistické hodnotenie*

Výsledky boli uvedené ako priemer±štandardná odchýlka (x±SD). Na štatistické hodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) s hladinou preukaznosti α=0,05 v software Statgraphics Centurion XV.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na mikrofotografiách rezov semenníkov samcov kontrolnej skupiny (Obrázok 1) bol pozorovaný normálny tvar a štruktúra tkanív semenníka. Priestor medzi jednotlivými kruhovitými až oválnymi semenotvornými kanálikmi vyplňalo kondenzované intersticiálne tkanivo. Vonkajší okraj obvodu kanálikov lemovala tesne prisadnutá bazálna membrána. Smerom do lúmenu na ňu v nepravidelných vrstvách nasadali deliace sa štádiá spermatogénnych buniek, medzi ktorými sa črtali Sertolihov bunky s charakteristickými bunkovými jadrami. Na apikálnych vrcholoch Sertolihov buniek boli v závislosti od fázy spermatogénneho cyklu uchytené spermatidy a spermie. Lúmen kanálikov vyplňali masy uvoľnených spermií. V intersticiálnom tkanive boli viditeľné najmä v okolí drobných krvných ciev zhľuky Leydigových buniek a občas i vláknitá štruktúra tkaniva. Hmotnosť semenníka, priemer a plochu semenotvorného kanálika zobrazuje tabuľka 1; absolútny objem štruktúr semenníka tabuľka 2 a parametre kvality ejakulátu tabuľka 3. Po perorálnom subchronickom podávaní diazinonu (40 mg.l<sup>-1</sup> počas 90 dní) nepreukazne poklesla hmotnosť a plocha semenníka a vzrástol priemer kanálika. **Toman et al. (2011)** po jednorazovom intraperitoneálnom podaní zaznamenali naopak preukazný vzostup hmotnosti semenníka a pokles priemeru kanálika, čo poukazuje na rozdielne pôsobenie v závislosti od dávky a spôsobu podávania. Najčastejšie histopatologické zmeny boli hromadné poškodenia spojení buniek epitelu a následné odumieranie a uvoľňovanie týchto más buniek zo semenotvorného epitelu do lúmenu (Obrázok 2a), čím sa preukazne znižoval priemer lúmenu (Tabuľka 2). Poškodenie spojení a odumieranie buniek by mohlo súvisieť s potenciálom diazinonu pre indukciu oxidačného stresu s následnými účinkami na tkanivá (**Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón, 2009b; Shah a Iqbal, 2010; Giordano et al., 2007**). Preukazný nárast zastúpenia epitelu, napriek jeho poškodzovaniu (odumieranie

**Tabuľka 1** Hmotnosť semenníka; priemer a plocha semenotvorného kanálika

Skupina	Hmotnosť semenníka (g)	Plocha kanálika ( $\mu\text{m}^2$ )	Priemer kanálika ( $\mu\text{m}$ )
	$x \pm SD$		
<b>Kontrola</b>	1,45±0,25	376,61±63,07	240,09±19,69
<b>Diazinon</b>	1,39±0,22	335,26±54,00	254,23±19,61

$x$ -priemer,  $SD$ -štandardná odchýľka

**Tabuľka 2** Absolútny objem štruktúr semenníka ( $\mu\text{m}^3$ )

Skupina	Semenotvorný epitel	Prázdne miesta v epiteli	Lúmen kanálika	Intersticiálne tkanivo	Krvné cievy
	$x \pm SD$				
<b>Kontrola</b>	90,41±4,04	0,53±1,03	32,90±4,22	15,24±2,83	0,41±0,37
<b>Diazinon</b>	100,02±6,83**	1,27±1,23	14,12±5,07***	16,43±4,70	1,45±0,52***

$x$ -priemer,  $SD$ -štandardná odchýľka; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

**Tabuľka 3** Parametre kvality ejakulátu

Parameter	Kontrola	Diazinon
	$x \pm SD$	
Koncentrácia	0,17±0,12	0,64±0,77
% Pohyblivosť	29,66±15,88	39,87±18,85
% Progresívna pohyblivosť	13,82±10,46	20,00±14,54
DAP	21,01±4,58	24,55±3,57
DCL	33,78±8,22	37,54±5,41
DSL	16,32±2,89	19,43±3,37*
VAP	53,39±12,65	62,44±9,34
VCL	84,87±21,58	95,01±14,48
VSL	41,42±7,85	49,16±8,52*
STR	0,79±0,05	0,79±0,04
LIN	0,52±0,08	0,53±0,04
WOB	0,65±0,08	0,66±0,03
ALH	5,49±1,13	6,76±1,06*
BCF	17,90±1,75	17,95±2,73

$x$  – priemer;  $SD$  – štandardná odchýľka; \*  $P < 0,05$

a uvoľňovanie buniek), by mohol byť kompenzačným reparačným mechanizmom diazinonom poškodeného epitelu. Medzi histopatologické zmeny s nižším výskytom patrili vznik trhlín v epiteli a odlupovanie sa bazálnej membrány i s niekoľkými bunkami epitelu (Obrázok 2b), čo rovnako svedčí o poškodení bunkových spojení. Zriedkavý bol výskyt prázdnych miest v epiteli – vakuolizácia (Obrázok 2a), ktorý sa v morfometrickom hodnotení neprejavil preukazne. V interstíciu bola veľmi zriedkavo pozorovaná fibrotizácia a jeho zastúpenie korešpondovalo s výsledkami kontroly. Naopak, **Toman et al. (2011)** zaznamenali po jednorazovom intraperitoneálnom podaní diazinonu edém a preukazný

nárast zastúpenia interstícia, čo môže súvisieť s intenzívnejšou akútnou stresovou reakciou pri danom experimente. Významným morfometrickým nálezom bol preukazný nárast objemového zastúpenia - dilatácie ciev, ako komponentov krvnenia všetkých štruktúr semenníka a zásobením organizmu testosterónom a inými androgénmi. Naše nálezy korešpondujú s nálezmi **Kojima et al. (1993)**, ktorý zaznamenali hypotenzívny-dilatačný účinok diazinonu na izolovanú aortu potkana cholinergným účinkom diazinonu na hladkosvalové bunky aorty. Rovnako, **Cabaj et al. (2010)** zaznamenali dilatáciu krvných ciev po intraperitoneálnom podaní diazinonu. Naš nález ukazuje, že dilatčný účinok diazinonu sa prejavuje

aj na iných krvných cievach i v *in vivo* experimentoch aj po subchronickom podávaní nízkych dávok. Nami pozorované zmeny (dilatácia ciev) by mohli súvisieť s produkciou testosterónu a iných androgénov. Zmeny v koncentráciách testosterónu po podaní diazinonu sú nejednoznačné a často rozporuplné (Okamura, et al., 2009; Alahyary, et al., 2008; Abd el-Aziz, Shalab, Abd el-Khalik, 1994; Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón, 2009b; El-Hoda, Zidan, 2009).

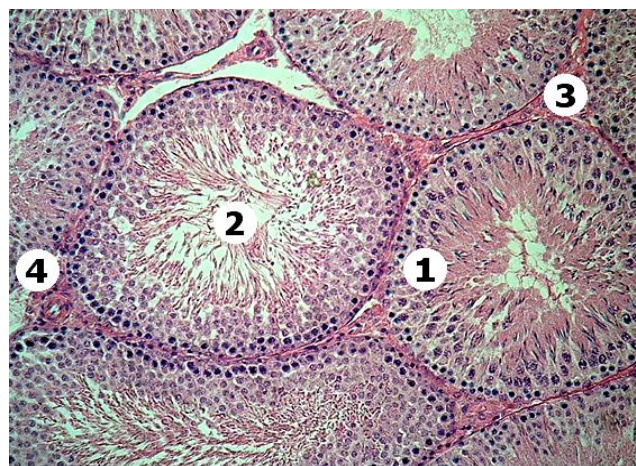
V hodnotení parametrov kvality ejakulátu došlo vo všetkých hodnotených parametroch experimentálnej skupiny k ich nárastu, z toho pri parametroch DSL, VSL a ALH boli tieto zmeny preukazné (Tabuľka 3). Sú dokázané súvislosti medzi výskytom diazinonu v prostredí a zníženou kvalitou ejakulátu mužov (Swan, 2006; Recio-Vega et al., 2008). Spermatotoxické účinky diazinonu u potkanov by mohli byť spôsobené histologickým poškodením hlavy prisenenníka a zalomené bičíky, cytoplazmatické

kvapôčky a redukovaná pohyblivosť spermií sú označované ako relevantné markery spermatotoxicity diazinonu (Okamura et al., 2009). Údaje iných autorov naznačujú, že spermie v poslednom kroku zretia sú cieľovým miestom pôsobenia diazinonu (Piña-Guzmán, Solís-Heredia, Quintanilla-Vega, 2005). Salazar-Arredondo et al. (2008) zaznamenali poškodenia chromatinu a DNA u spermií človeka, Piña-Guzmán, Solís-Heredia, Quintanilla-Vega (2005) poškodenie DNA u neskorých spermatíd a poškodenie chromatinu spermií u potkanov; Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón (2009a) poškodenia chromatinu a DNA spermií u myši. Priame zníženie plodnosti zníženou schopnosťou koncepcie u samcov potkanov potvrdili Abd el-Aziz, Shalab, Abd el-Khalik (1994). Zmeny najmä v parametroch DSL, VSL a ALH, ktoré sme zaznamenali v našom experimente naznačujú možné poškodenie stredového-mitochondriálneho úseku spermií, ktoré je miestom produkcie energie, alebo na poškodenie pohybového aparátu spermií, ktorý je zodpovedný za ideálny pohyb spermie; hypoteticky je možné prípadné

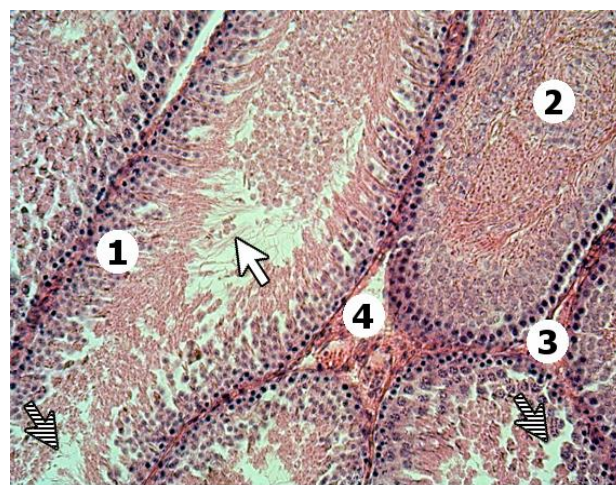
vylepšenie pohybových funkcií spermií počas priebehu spermatogenézy alebo počas zretia v prisenenníku, ako kompenzačná odpoveď na stimulačný podnet ich mierneho dlhodobého poškodzovania nízkou dávkou diazinonu. Okamura et al. (2009) nezaznamenali po subchronickom teste s diazinonom na potkanoch zmeny v koncentrácii AMP, ADP, ATP, ani v pomere ATP/ADP. V našom experimente použitá dávka bola jednou z najnižších spomedzi citovaných údajov. Je preto možné, že sme zachytili hraničnú dávku, ktorá ešte nespôsobovala CASA analýzou zaznamenateľné známky toxického pôsobenia na spermiách.

## ZÁVER

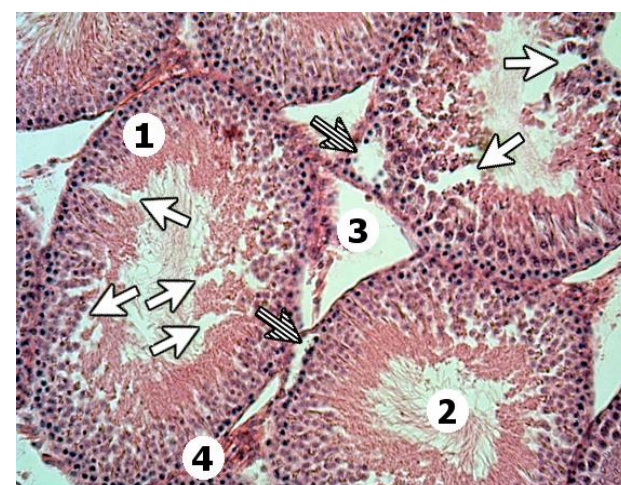
Diazinon v našom experimente spôsoboval dezintegráciu bunkových spojení zárodočného epitelu, čo následne vedie k odumieraniu a uvoľňovaniu zárodočných buniek do lúmenu semenotvorného kanálíka. Dilatácia krvných ciev a neznámy stimulačný účinok na kvalitu parametrov ejakulátu sú dva ďalšie hlavné popísané nálezy účinkov diazinonu. Diazinon



**Obrázok 1:** Semenník potkana kontrolnej skupiny (200x, HE). 1-semenotvorný epitel, 2-lúmen kanálíka so spermiami, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva



**Obrázok 2a:** Semenník potkana po p.o. podaní diazinonu (200x, HE). 1-semenotvorný epitel, 2-odumreté evakuované bunky epitelu v lúmene kanálíka, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva, šípka-bunky epitelu uvoľňujúce sa do lúmenu kanálíka, pružkovaná šípka-prázdne miesta v epiteli



**Obrázok 2b:** Semenník potkana po p.o. podaní diazinonu (200x, HE). 1-semenotvorný epitel, 2-lúmen kanálíka so spermiami, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva, biela šípka-poškodenie bunkových spojení-trhliny v epiteli, pružkovaná šípka-odlupovanie sa epitelu od bazálnej membrány

v subchronickom teste s nízkou dávkou spôsobuje stredné závažné až nízke histologické a morfometrické poškodenia a spôsobuje zmeny v parametroch kvality ejakulátu. Tieto poškodenia a zmeny sú čiastočne kompenzované neznámym regeneračným mechanizmom. Napriek našim zisteniam sú možné štrukturálne či funkčné poškodenia na subcelulárnej úrovni, ktoré môžu viesť k poklesu plodnosti. Na overenie našich hypotéz sú potrebné ďalšie výskumy.

## LITERATÚRA

ABD EL-AZIZ, A. M. I., SAHLAB, A. M., ABD EL-KHALIKA, A. M. 1994. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. In *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, vol. 101, 1994, no. 6, p. 230-232.

ALAHYARY, P., POOR, M. I., AZERBAIJANI F. F., NEJATI, V. 2008. The potential toxicity of diazinon on physiological factors in male rat. In *Pak. J. Biol. Sci.*, vol. 11, 2008, no. 1, p. 127-130.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008. *Toxicological profile for diazinon*. U. S. Department of health and human services, 2008. 298 p.

CABAJ, M., TOMAN, R., ADAMKOVIČOVÁ, M., MASSÁNYI, P., ŠIŠKA, B., LUKÁČ, N., GOLIAN, J. 2010. Structural changes in the rat testis caused by diazinon and selenium. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, p. 8-16.

EL-HODA, N., ZIDAN, A. 2009. Evaluation of the reproductive toxicity of chlorpyrifos methyl, diazinon and profenofos pesticides in male rat. In *Int. J. of Pharm.*, vol. 5, 2009, no. 1, p. 51-57.

GIORDANO, G., AFSHARINEJAD, Z., GUIZZETTI, M., VITALONE, A., KAVANAGH, T. J., COSTA, L. G. 2007. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. In *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 219, 2007, no. 2-3, p. 181-189.

INCHEM – International programe for chemical safety, 2012. Available online: <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest45\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest45_e.htm)>.

JUREWICZ, J., HANKE, W., RADWAN, M., BONDE, J. P. 2009. Environmental factors and semen quality. In *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.*, vol. 22, 2009, no. 4, p. 305-329.

LATENDRESSE, J. R., WARBRITTON, A. R., JONASSEN, H., CREAMY, D. M. 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. In *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, 2002, no. 4, p. 524-533.

KASHANIAN, S., GHOLIVAND, M. B., AHMADI, F., RAVAN, H. 2008. Interaction of diazinon with DNA and the protective role of selenium in DNA damage. In *DNA Cell Biol.*, vol.27, 2008, no. 6, p. 325-332.

KOJIMA, T., TSUDA, S., SHIRASU, Y. 1993. Inhibitory effect of fenthion and diazinon on the contraction of rat aorta, and its contribution to lethality. In *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 55, 1993, no. 3, p. 383-385.

MAXWELL, L. B., DUTTA, H. M. 2005. Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. In *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 60, 2005, no. 1, p. 21-27.

OKAMURA, A., KAMIJIMA, M., OHTANI, K., YAMANOSHITA, O., NAKAMURA, D., ITO, Y., MIYATA, M., UEYAMA, J., SUZUKI, T., IMAI, R., TAKAGI, K., NAKAJIMA, T. 2009. Broken sperm,

cytoplasmic droplets and reduced sperm motility are principal markers of decreased sperm quality due to organophosphorus pesticides in rats. In *J. Occup. Health.*, vol. 51, 2009, no. 6, p. 478-487.

OOSTINGH, G. J., WICHMANN, G., SCHMITTNER, M., LEHMANN, I., DUSCHL, A. 2009. The cytotoxic effects of the organophosphates chlorpyrifos and diazinon differ from their immunomodulating effects. In *J. Immunotoxicol.*, vol. 6, 2009, no. 2, p. 136-145.

PIÑA-GUZMÁN, B., SOLÍS-HEREDIA, M. J., QUINTANILLA-VEGA, B. 2005. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. In *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 202, 2005, no. 2, p. 189-198.

RASFF, 2012. Available online: <<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/#>>.

RASTOGI, S. K., SATYANARAYAN, P. V. V., RAVISHANKAR, D., TRIPATHI, S. 2009. A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying. In *Indian J. Occup. Environ. Med.*, vol. 13, 2009, no. 3, p. 131-134.

RECIO-VEGA R., OCAMPO-GÓMEZ G., BORJA-ABURTO V.H., MORAN-MARTÍNEZ J., CEBRIAN-GARCIA M. E. 2008. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: association between sperm parameters and urinary pesticide levels. In *J. Appl. Toxicol.*, vol. 28, 2008, no. 5, p. 674-680.

ROEGGE, C. S., TIMOFEEVA, O. A., SEIDLER, F. J., SLOTKIN, T. A., LEVIN, E. D. 2008. Developmental Diazinon Neurotoxicity in Rats: Later Effects on Emotional Response. In *Brain Res. Bull.*, vol. 75, 2008, no. 1, p. 166-172.

ROELEVELD, N., BREVELD, R. 2008. The impact of pesticides on male fertility. In *Curr Opin. Obstet Gynecol.*, vol. 20, 2008, no. 3, p. 229-233.

RUSH, T., LIU, X. Q., HJELMHAUG, J., LOBNER, D., 2010. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. In *Neuroscience*, vol. 166, 2010, no. 3, p. 899-906.

SALAZAR-ARREDONDO, E., DE JESÚS SOLÍS-HEREDIA, M., ROJAS-GARCÍA, E., HERNÁNDEZ-OCHOA, I., QUINTANILLA-VEGA, B. 2008. Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. In *Reprod. Toxicol.*, vol. 25, 2008, no. 4, p. 455-460.

SARABIA, L., MAURER, I., BUSTOS-OBREGÓN, E., 2009a. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. In *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 72, 2009a, no. 2, p. 663-668.

SARABIA, L., MAURER, I., BUSTOS-OBREGÓN, E., 2009b. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. In *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 72, 2009b, no. 3, p. 938-942.

SHAH, M. D., IQBAL, M., 2010. Diazinon induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, 2010, no. 12, p. 3345-3353.

SLOTKIN, T. A., SEIDLER, F. J., 2007. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. In *Brain Res. Bull.*, vol. 72, 2007, no. 4-6, p. 232-274.

SLOTKIN, T. A., SEIDLER, F. J., 2009. Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 cells. In *Environ. Health Perspect.*, vol. 117, 2009, no. 4, p. 587-596.

SWAN, S. H., 2006. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. In *Int. J. Androl.*, 2006, vol. 29, no. 1, p. 62-68.

SWAN, S. H., KRUSE, R. L., LIU, F., BARR D. B., DROBNIS, E. Z., REDMON, J. B., WANG, C., BRAZIL, C., OVERSTREET, J. W. 2003. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. In *Environ. Health Perspect.*, vol. 111, 2003, no.12, p. 1478-1484.

TOMAN, R. ADAMKOVIČOVÁ, M., HLUCHÝ, S., CABAJ, M., GOLIAN, J. 2011. Quantitative analysis of the rat testes after an acute cadmium and diazinon administration. In *Animal Science and Biotechnologies*, vol. 44, 2011, no. 2, p. 188-191.

UHRÍN, V., KULÍŠEK, V., 1980. Využitie morfoloických metód pre stanovenie hrúbky svalových vlákien. In *Živočíšna výroba*, vol. 53, 1980, no. 12, p. 935-942.

WECKER, L., MRAK, R. E., DETTBARN, W. D. 1985. Evidence of necrosis in human intercostal muscle following inhalation of an organophosphate insecticide. In *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, vol. 6, 1985, no. 2, p. 171-175.

YEHIA, M. A., EL-BANNA, S. G., OKAB, A. B. 2007. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. In *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 59, 2007, no. 3-4, 215-225.

**Acknowledgments:** This work was supported by grant VEGA 1/0532/11.

### Contact address:

Michal Cabaj, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414503, E-mail: xcabaj@is.uniag.sk

Róbert Toman, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414479, E-mail: robert.toman@uniag.sk

Mária Adamkovičová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414466, E-mail: maria.adamkovicova@uniag.sk

Peter Massányi, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414284, E-mail: peter.massanyi@uniag.sk

Branislav Šiška, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, E-mail: branislav.siska@gmail.com

Norbert Lukáč, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414349, E-mail: norbert.lukac@uniag.sk

Jozef Golian, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414325, E-mail: jozef.golian@uniag.sk

Svätoslav Hluchý, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414469, E-mail: svatoslav.hluchy@uniag.sk