

ŠTRUKTURÁLNE ZMENY SEMENNÍKOV PO INTRAPERITONEÁLNEJ APLIKÁCII DIAZINONU A SELÉNU

STRUCTURAL CHANGES IN THE TESTIS CAUSED BY DIAZINON AND SELENIUM

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

ABSTRACT

The aim of this study was to find the structural changes in the rat testis after a diazinon, selenium and their combined administration. The testis structural changes after the diazinon intraperitoneal administration of 20 mg.kg⁻¹ b.w., selenium 2 mg.kg⁻¹ b.w. and both diazinon 20 mg.kg⁻¹ b.w. and selenium 2 mg.kg⁻¹ b.w. were evaluated by histological and morphometric methods in light microscopy. 36 hours after the diazinon i.p. administration, the vacuolization of the seminiferous epithelium, evacuation of germ cells into the tubule lumen, epithelium necrosis and disintegration, interstitium extension and fibrotization were observed. The germ cells released from the basal lamina and subsequently they were visible in the tubule lumen. Blood vessels were damaged and morphometric analysis have shown their significant dilatation ($P < 0.05$). Diazinon causes the damage of the germinal epithelium in the testes leading to the spermatogenesis failure. The infertility can then appear. In selenium treated group disintegration of cellular associations in the seminiferous epithelium, damaged and separating spermatids lines, reduced spermatogenesis and significant vacuolization of seminiferous epithelium ($P < 0.0001$) were observed. Similar changes as in selenium treated group occurred, significant vacuolization of seminiferous epithelium ($P < 0.05$) was seen. In combined diazinon and selenium treated group protective effects of selenium in seminiferous epithelium and interstitium were noticed. Further investigation of diazinon and selenium is needed to practical use this results.

Keywords: diazinon, selenium, testis, histology, morphometry, rat

ÚVOD

Diazinon je organofosforečný pesticíd, určený na ničenie rôzneho škodlivého hmyzu. Patrí sem pôdny hmyz, škodcovia na ovocí, zelenine, krmive, kultúrnych plodinách a rozmanitý hmyz v ňom zamorených oblastiach, domácnostiach. Používa sa tiež na reguláciu kožných parazitov zvierat. Má dlhú perzistenciu a relatívne nízku toxicitu pre cicavce (EPA, 2006; Melendres et al., 1993). Toxicita diazinonu je zapríčinená inhibíciou enzymatického - cholinesterázového odbúravania cholinergných mediátorov nervového vzruchu (acetylcholínu) na takto inervovaných miestach organizmu. Pôsobenie sa prejavuje navonok príznakmi otravy, ako sú bolesti hlavy, úzkosť, slabosť, strach, rozšírené zrenice, rozmazané videnie, nevoľnosť, zvracanie, kŕče brucha, hnačka, sťažené dýchanie, kóma až smrť (ATSDR, 2008). Diazinon vykazuje silný účinok na pohlavný systém samcov. Organofosforečné pesticídy všeobecne spôsobujú zníženie počtu spermíí (Recio-Vega et al., 2008). Na molekulárnej úrovni diazinon spôsobuje oxidatívny stres a tým zvýšenú peroxidáciu lipidov, čo sa prejavuje na bunkových organelách, bunkách a nimi tvorených štruktúrach – tkanivách, orgánoch (Okamura et al., 2009; Harris et al., 2009; Oostingh et al., 2009; Salazar-Arredondo et al., 2008; Sarabia et al., 2009). Zaznamenané boli genotoxické účinky diazinonu na DNA spermíí potkanov a myši (Sarabia et al., 2009a; Salazar-Arredondo et al., 2008). Diazinon spôsobuje histopatologické zmeny a zvýšenie lokálnej apoptózy v semeníkoch myši (Sarabia et al., 2009b). Toxické účinky diazinonu sa teda prejavujú komplexne na fyziologických, biochemických a histopatologických zmenách zasiahnutého organizmu (Yehia et al., 2007). Niektorí autori navrhujú využívať účinky silných antioxidantov

(melatonínu) na zníženie negatívnych účinkov diazinonu (Sarabia et al., 2009b)

Selén je esenciálny mikroelement s rozmanitými funkciami v živom organizme. Pri vysokých dávkach pôsobí toxicky. Ako kofaktor sa zúčastňuje dejodácie tyreoidálnych hormónov (ATSDR, 2003). Je súčasťou antioxidantných enzýmov ako seléndependentnej glutatiónpoxidázy a ďalších antioxidantných pôsobiacich látok ochraňujúcich membrány buniek a DNA pred poškodením voľnými radikálmi. Selén teda zohráva významnú úlohu pri vzniku nádorových, kardiovaskulárnych, ale aj iných ochorení, funkciách imunitného systému, starnutí organizmu a pri pôsobení toxických látok (Wojtczak, 2003; Sun, Mu a Ma et al., 2005; ATSDR, 2003). Pôsobí ochranné pred toxickými účinkami niektorých ťažkých kovov – kadmia, ortuti, hlinníka (Xu et al., 2003; Mozofarian, 2009; El-Demerash, 2004; Abubakar et al., 2003). Výrazné je pôsobenie na pohlavný systém samcov. Pri prekročení optimálnych dávok pôsobí toxicky na štruktúry semenníka (Kaur a Kaur, 2000; Parshad a Sud, 1989; Chowdhury a Venkatakrishna-Bhat, 1983; Nebbia et al., 1987). Selén vo forme selénoproteínu P a seléndependentnej fosfolipidovej hydroxiperoxidovej glutatiónpoxidázy (PHGPx) je u cicavcov nevyhnutný pre normálny priebeh spermatogenézy (Boitani a Puglishi, 2008). Zistené boli pozitívne účinky selénu na Leydigove bunky a sekréciu testosterónu u mužov (Akinloye et al., 2005). Známe sú účinky selénu v prevencii rakoviny prostaty (Clark et al., 1998). Selén podporuje plodnosť samcov a mužov zvýšenou produkciou a zlepšením pohyblivosti spermíí (Keskes-Ammar et al., 2003). Mnohí autori navrhujú využívať rôzne formy selénu ako indikátor parametrov kvality ejakulátu u zvierat (Stradioli et al., 2009; Kaoruko, 1999) a ľudí (Shinohara et al., 2005; Foresta,

Flohé a Garolla, 2002). Selén samostatne alebo v kombinácii s vitamínom E alebo N-acetylcysteínom sa odporúča využívať na liečbu niektorých foriem neplodnosti mužov (Keskes-Ammar et al, 2003; Safarinejad a Safarinejad, 2009).

Takmer neznáme sú účinky kombinácie a interakcií diazinonu a selénu. Kashanian et al. (2008) uvádzajú ochranné pôsobenie selénu pred škodlivými účinkami diazinonu na DNA týmusu teliat. Autori inej štúdie zaznamenali oproti účinku samotného diazinonu výraznejší, ale štatisticky nepreukazný pokles aktivity cholinesterázy v krvnej plazme potkanov po podaní kombinácie selénu a diazinonu, čo značí možné znásobenie účinku na pokles aktivity cholinesterázy (Šiška et al., 2008) s následným účinkom na tkanivá.

Cieľom experimentu bolo popísať a vyhodnotiť štrukturálne zmeny semenníka potkana po intraperitoneálnom podaní selénu, diazinonu a ich kombinácie.

MATERIÁL A METODIKA

40 samcov potkanov línie Wistar vo veku 3 mesiace bolo náhodne rozdelených do štyroch skupín po 10 nasledovne – kontrolná skupina (K), skupina s podaním selénu (Se), diazinonu (DZN) a kombinácie diazinonu a selénu (DZN+Se). 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. Samcom skupiny Se bol podaný jednorazovo intraperitoneálne selén (Reachem, Bratislava) vo forme seleničitanu sodného v dávke 2 mg.kg⁻¹. Samcom skupiny DZN sa aplikoval jednorazovo intraperitoneálne diazinon (Sigma-Aldrich, USA) v dávke 20 mg.kg⁻¹. Tretej skupine samcov (DZN+Se) bol podaný diazinon v dávke 20 mg.kg⁻¹ a selén 2 mg.kg⁻¹ v samostatnej aplikácii v rovnakom čase. Po 36

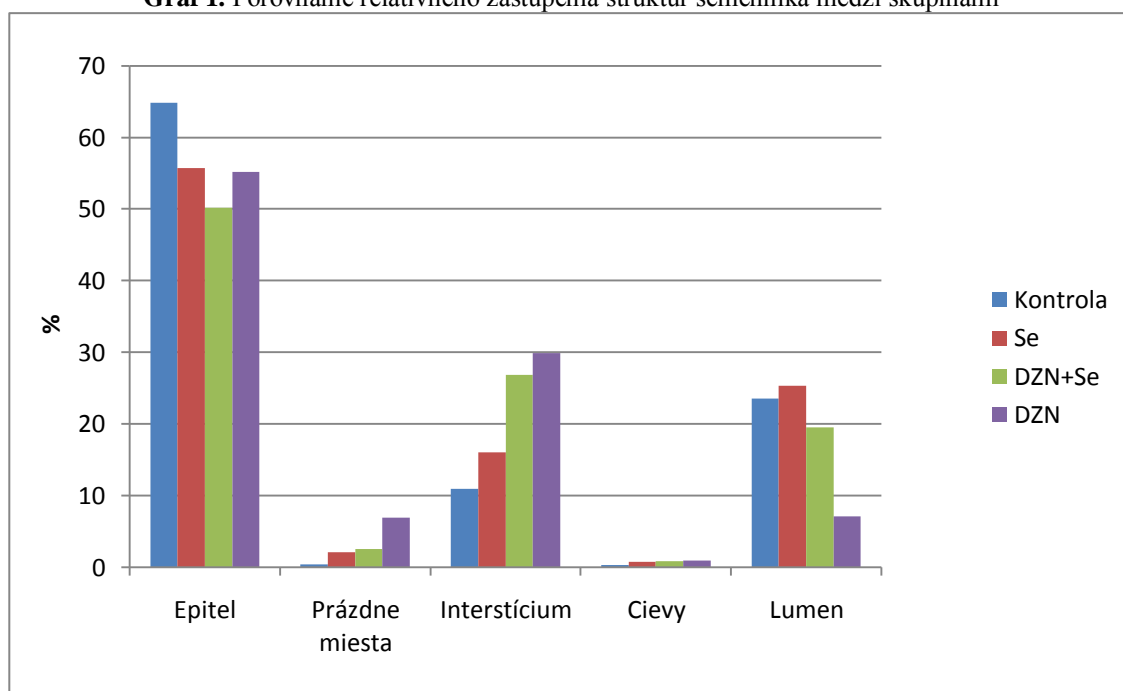
hodinách boli všetci samci usmrtení humánnym spôsobom, vykonala sa anatomická pitva a odobrali sa vzorky semenníkov, ktoré sa fixovali v modifikovanom Davidsonovom roztoku (Latendresse et al., 2002). Vzorky sa oľadili hematoxilín-eozínom a skúmali sa v svetelnom mikroskope Nikon Eclipse E600. Hodnotenie mikrofotografií bolo uskutočnené komputervizovaným systémom vyhodnocovania pomocou PC morfometrického softwaru M.I.S. Quick Photo a mikroskopom Olympus AX 70. V semenníku sa vyjadřilo percentuálne zastúpenie semenotvorného epitelu semenníka, prázdnych miest v semenotvornom epiteli, lúmenu semenotvorných kanálikov, interstícia, krvných ciev v interstíciu. Rozdiely medzi jednotlivými skupinami boli vyjadřené ako rozdiely variability rozptylu priemerov jednotlivých vzoriek medzi skupinami, čo bolo štatisticky zhodnotených jednocestnou analýzou rozptylu (ANOVA) v software Minitab v. 15.1.30.0 na hladine preukaznosti $\alpha=0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na mikroskopických preparátoch kontrolnej skupiny bola pozorovaná normálna štruktúra semenotvorných kanálikov a intersticiálneho tkaniva. Semenotvorné kanáliky mali kruhovitý až výrazne elipsovité tvar. Boli zreteľne ohraničené neporušenou bazálnou membránou s prebiehajúcou spermatogenezou. Na bazálnu membránu nasadali Sertolihov, spermatogónie, spermatocyty, spermatidy až po spermie uvoľňujúce sa do lúmenu semenotvorného kanáliku. Priestor medzi jednotlivými kanálikmi vyplňalo úzke intersticiálne tkanivo s viditeľnými krvnými cievami a Leydigovými bunkami (Obrázok 1). Relatívne zastúpenie hodnotených štruktúr medzi skupinami udáva graf 1 a tabuľka 1.

Po intraperitoneálnom podaní 20 mg.kg⁻¹ diazinonu sme pozorovali výrazné poškodenia semenotvorného epitelu a rozšírenie intersticiálneho tkaniva. Na mnohých miestach sa od epitelu oddeľovala bazálna membrána. Porušením štruktúry až rozpadom semenotvorného epitelu vznikli v

Graf 1. Porovnanie relatívneho zastúpenia štruktúr semenníka medzi skupinami



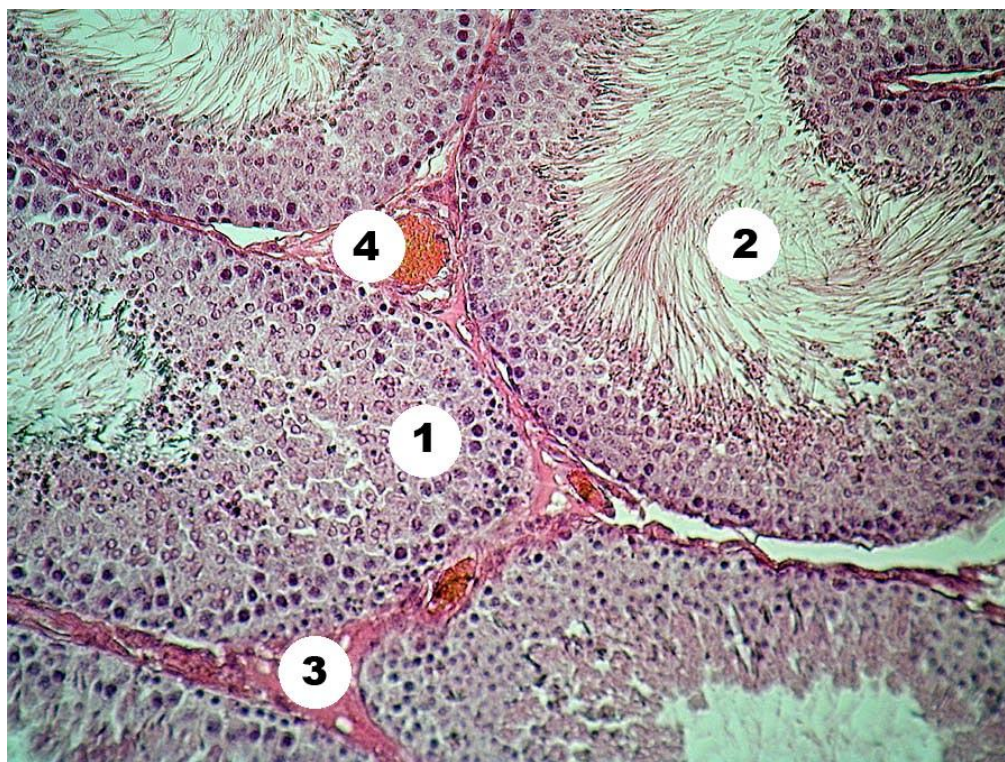
Tabuľka 1 Porovnanie relatívneho zastúpenia štruktúr semenníka medzi skupinami (%)

Skupina	Semenotvorný epitel	Prázdne miesta v epiteli	Interstícium	Cievy	Lúmen kanálik
	X ± SD				
Kontrola	64,82±7,24	0,38±1,02	10,93±4,31	0,29±0,53	23,58±8,91
Se	55,74±9,11	2,07±2,28***	16,10±6,73	0,76±3,01	25,33±9,48
DZN+Se	50,18±7,63	2,56±2,10*	26,89±9,60	0,84±1,66	19,53±9,61
DZN	55,16±9,90	6,90±5,55	29,87±9,45	0,94±1,45	7,14±8,29

X-priemer, SD-štandardná odchýlka; * P<0,05; *** P<0,0001

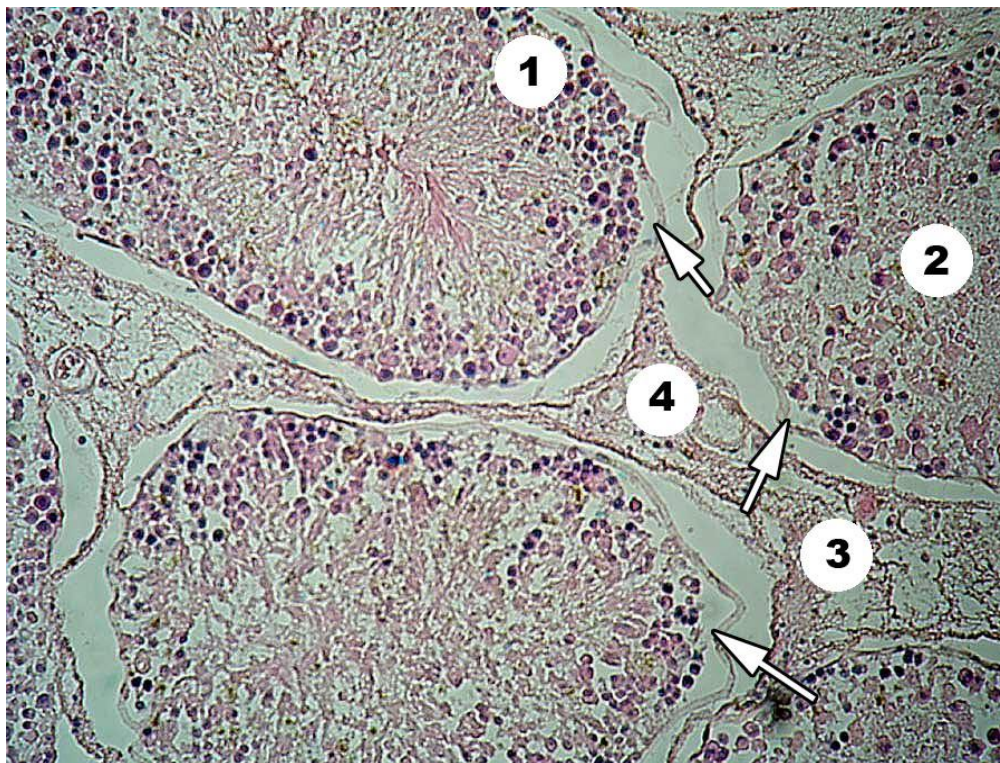
epiteli prázdne miesta. Výrazná bola deluminizácia kanálikov spôsobená týmto rozpadom a uvoľnením sa zárodočných buniek zo semenotvorného epitelu do lúmenu kanáliku. V ľahších prípadoch boli v lúmene kanáliku pozorované masy poškodených alebo odumretých spermií, v najťažších prípadoch bolo pozorované úplné zastavenie spermatogenézy po rozpade a dezintegrácii nekrotizovaného epitelu. Podobné poškodenia semenotvorného epitelu vo forme poškodenia spermatíd a v zmenách ich veľkosti pozorovali **Dutta a Meijer (2003)** pri sledovaní účinku diazinonu na semenníky rýb. Takisto **Piña-Guzmán et al. (2005)** pozorovali poškodenia spermatíd po intraperitoneálnom podaní diazinonu myšiam (8,12 mg.kg⁻¹ po dobu 8 a 15 dní). Zmeny v narušení spermatogenézy pozorovali aj **El-Hoda a Zidan (2009)** pri orálnom podávaní 50 mg.kg⁻¹ diazinonu počas 65 dní potkanom. Zistili zmeny v počte, pohyblivosti spermií

a ich morfológických abnormalitách. Tiež **El-Aziz et al. (1994)** pozorovali pri orálnom podávaní diazinonu potkanom v dávke 1,5 alebo 3 mg.kg⁻¹ počas 65 dní zvýšené percento odumretých alebo morfológicky abnormálnych spermií a ich zníženú oplodňovaciu schopnosť oproti kontrole. **Earl et al. (1971)** pozoroval u biglov po podávaní kapsúl obsahujúcich diazinon v kukuričnom oleji (20 mg.kg⁻¹ počas 8 mesiacov) rovnako, ako v našom experimente zastavenie spermatogenézy. Pozorované bolo aj výrazné rozšírenie interstícia so zmmnožením kolagénových vlákien – fibrotizácia tkaniva a nekrotizácia Leydigových buniek. Tieto zmeny by potencionálne mohli súvisieť aj s následnou produkciou testosterónu. Rozličné zmeny v koncentráciách testosterónu po aplikácii diazinonu zaznamenali viacerí autori. **El-Aziz et al. (1994)** zistil po orálnom podávaní diazinonu potkanom v dávke 1,5 alebo 3 mg.kg⁻¹ počas 65 dní pokles hladiny plazmatického testosterónu a zníženú oplodňovaciu schopnosť oproti kontrolnej skupine. Podobné výsledky v poklese hladiny testosterónu zaznamenal po orálnom podávaní 50 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti diazinonu po dobu 65 dní **El-Hoda a Zidan (2009)** u potkanov. Naproti tomu, **Alahyary et al.**

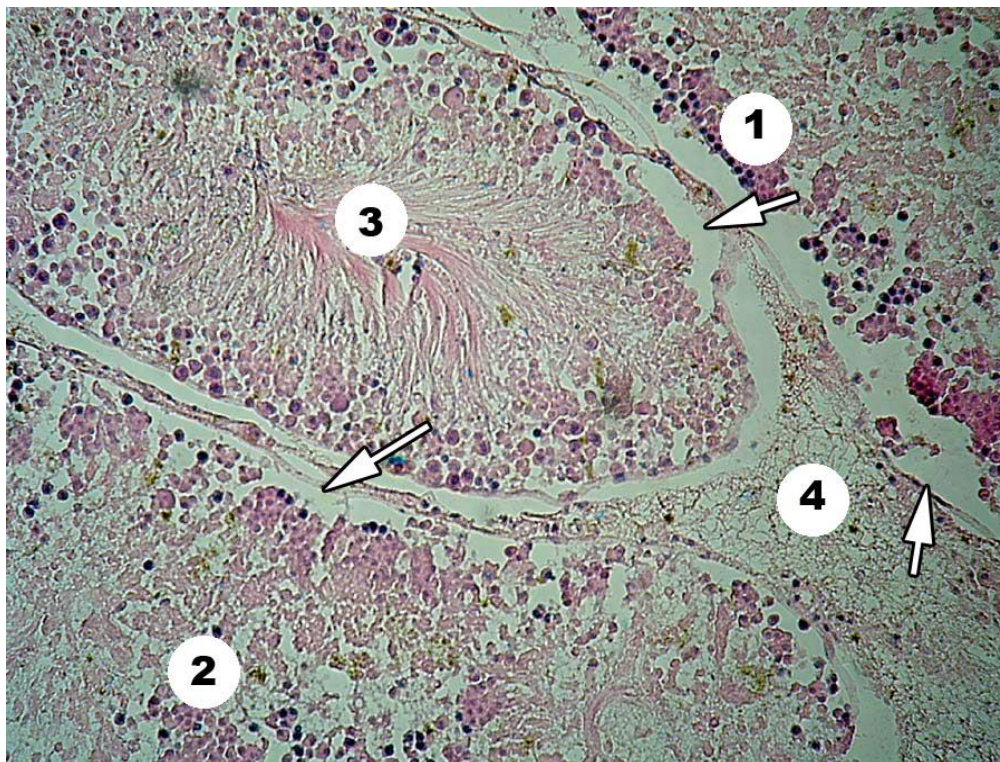


Obrázok 1: Semenník potkana kontrolnej skupiny (200x, HE).

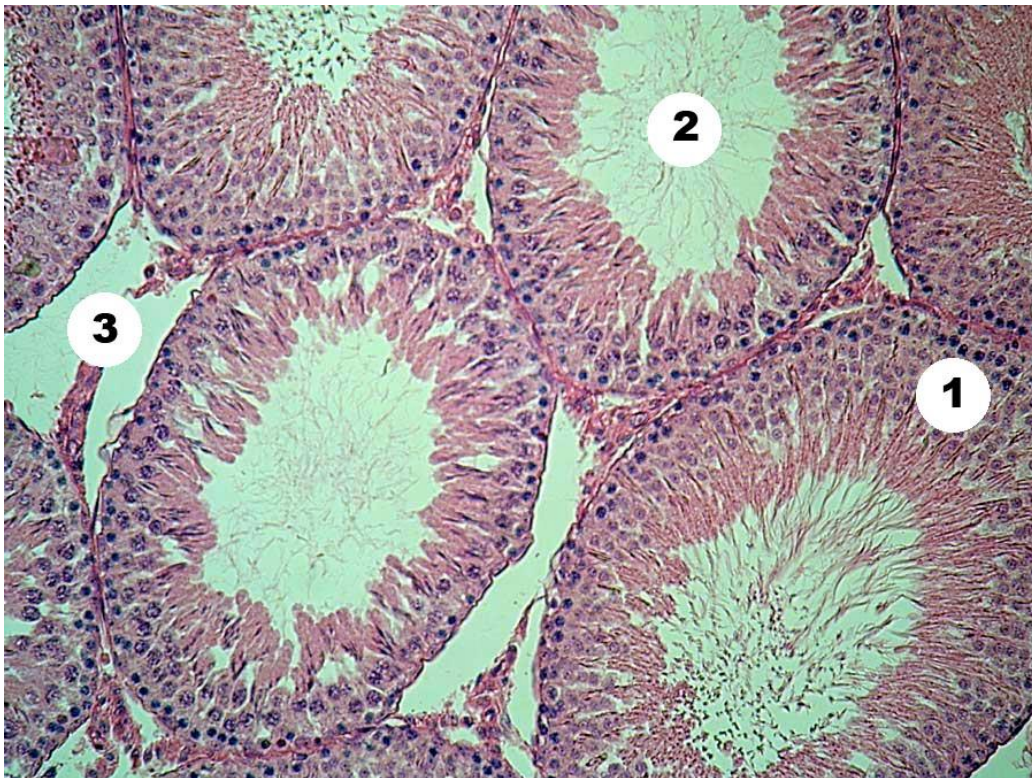
1-semenotvorný epitel, 2-lúmen kanáliku so spermiami, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva.



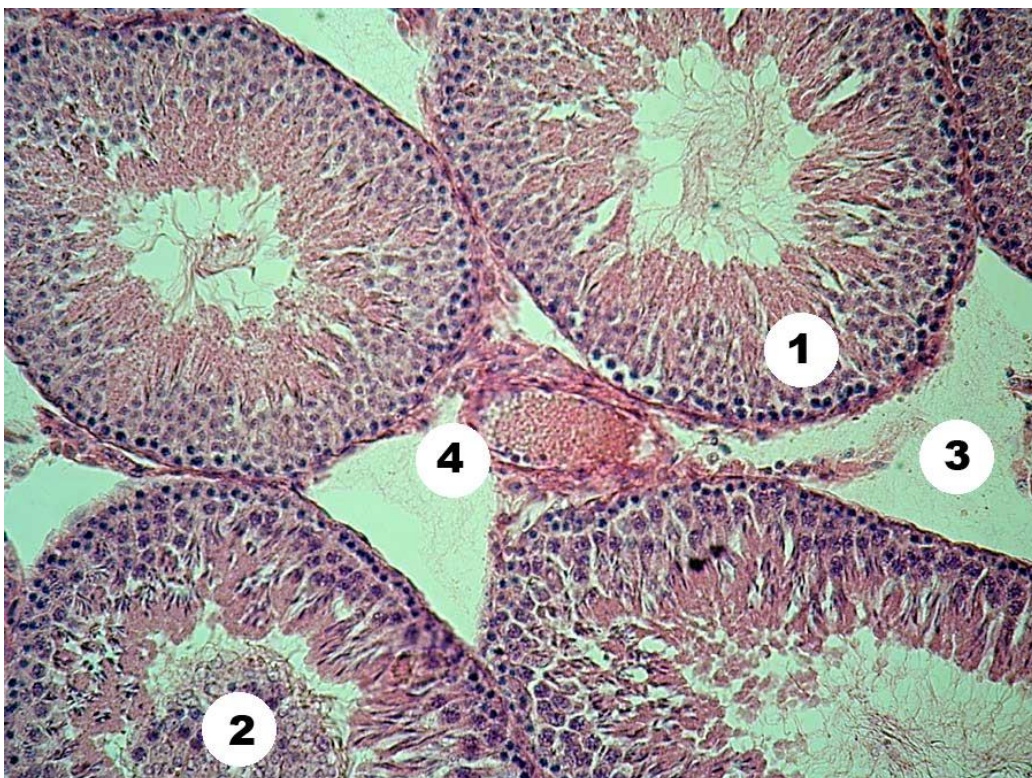
Obrázok 2a. Semenník potkana po i.p. podaní diazinonu (200x, HE).
1-dezintegrovateľný nekrotizovaný epitel, 2-lúmen vyplnený bunkami epitelu, 3-rozšírené interstícium s nekrotizovanými Leydigovými bunkami, 4-dilatovaná poškodená cieva, šípka-odlupovanie epitelu od bazálnej membrány.



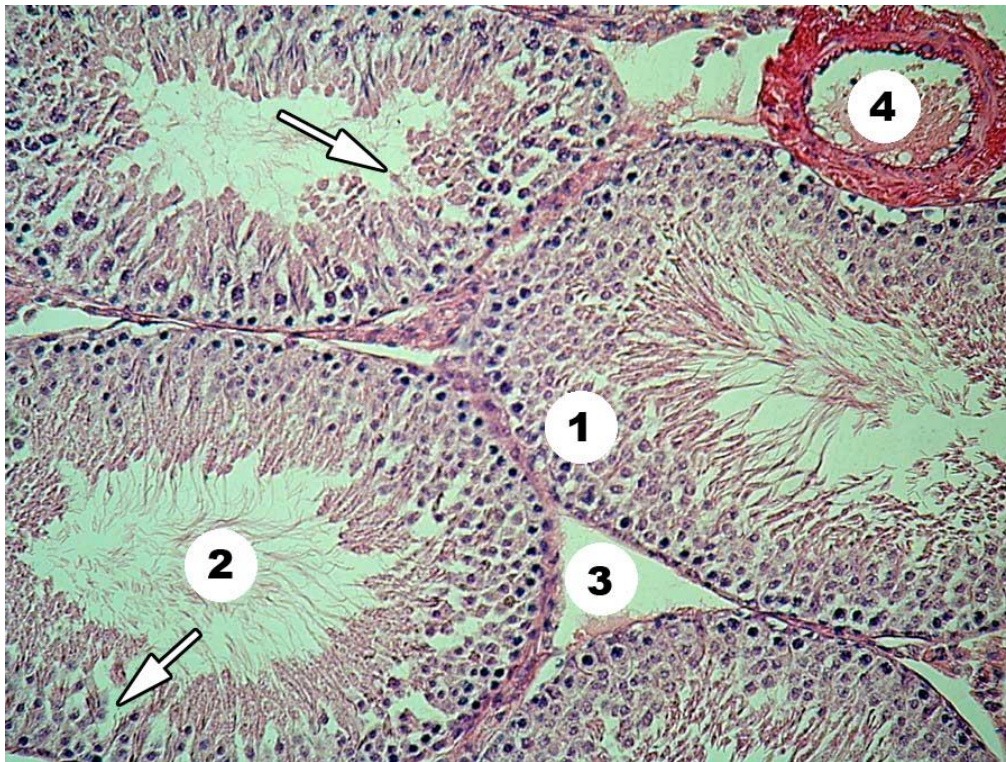
Obrázok 2b: Semenník potkana po i.p. podaní diazinonu (200x, HE).
1-nekrotizovaný epitel, 2-odumreté bunky epitelu v lúmene kanálíka, 3-lúmen kanálíka s dezintegrovateľným epitelom a rozpadávajúcimi sa spermiami, 4-rozšírené interstícium, šípka-odlupovanie epitelu od bazálnej membrány.



Obrázok 3a: Semenník potkana po i.p. podaní selénu (200x, HE).
1-semenotvorný epitel, 2-intersticiálne tkanivo, 3-lúmen kanáliku so spermami .



Obrázok 3b: Semenník potkana po i.p. podaní selénu (200x, HE).
1-semenotvorný epitel, 2-lúmen s odlúpnutými bunkami epitelu, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva.



Obrázok 4a: Semenník potkana p i.p. podaní diazinonu a selénu (200x, HE).
1-semenotvorný epitel, 2-lúmen so spermiami, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva, šípka-prázdne miesta v epiteli.



Obrázok 4b: Semenník potkana po i.p. podaní diazinonu a selénu (200x, HE).
1-semenotvorný epitel, 2-lúmen s odlúpnutými bunkami epiteli, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva, šípka-prázdne miesta v epiteli.

(2008) zaznamenal po orálnom podávaní diazinonu potkanom v subakútnom teste počas 28 dní zvýšenie plazmatickej hladiny testosterónu. **El-Hoda a Zidan (2009)** pozorovali u potkanov zníženú sekréciu folikulostimulačného hormónu a luteinizačného hormónu pri podávaní 50 mg.kg⁻¹ diazinonu orálne počas 65 dní, ako hormónov hypofýzy zabezpečujúcich sekréciu testosterónu a normálny priebeh spermatogenézy v semenníkoch. V našom experimente boli cievy oproti kontrolnej skupine poškodené, zmnôžené a dilatované, čo štatisticky potvrdilo aj morfometrické hodnotenie zvýšením relatívneho zastúpenia ciev (P<0,05). Najčastejšie pozorované zmeny sú vyznačené na obrázku 3.

V skupine s podaním 2 mg.kg⁻¹ selénu sa prejavili degeneratívne histopatologické zmeny v spojení buniek semenotvorného epitelu. To spôsobovalo v niektorých kanálikoch uvoľňovanie buniek epitelu, deluminizáciu kanálikov a štatisticky vysokopreukazný vznik prázdnych miest v epiteli (P<0,0001). Došlo tiež k zníženiu výšky epitelu. Uvádzané zmeny sú viditeľné na obrázku 2. Podobné zmeny v znížení výšky epitelu a počtu spermatogénnych buniek, poškodení bunkových spojení boli pozorované po perorálnom podávaní 6 a 8 ppm selénu potkanom po dobu 6, resp. 9 týždňov (**Kaur a Kaur, 2000**). Ďalší autori uvádzajú podobné výsledky po skrmovaní na selén bohatej pšenice potkanmi. Zaznamenali poškodenie semenotvorného epitelu – poškodenie spermatogénnych buniek, tvorenie zhľukov spermatíd a uvoľňovanie spermatogénnych buniek do priestorov lúmenu kanálikov. Tieto zmeny boli závislé od dávky a dĺžky času podávania selénu (**Parshad a Sud, 1989**). **Nebbia et al. (1987)** zaznamenali u potkanov po podávaní 16 ppm selénu potkanom v pitnej vode degenerované spermatídy, oligospermiu a intertubulárny edém. Uvádzajú od dávky závislé zmeny v poškodení štruktúr semenníka. **Chowdhury a Venkatakrishna-Bhat (1983)** zaznamenali po orálnom podávaní 6 a 10 µg Se počas 90 dní významné poškodenia spermatogénnych buniek a celkovú degeneráciu semenníka, čo viedlo k atrofii semenníkov.

Histopatologické zmeny po podaní kombinácie diazinonu 20 mg.kg⁻¹ a selénu 2 mg.kg⁻¹ (obrázok 4) boli podobné ako v skupine s podaním selénu, no zároveň boli omnoho menej výrazné ako v skupine s podaním diazinonu. Poškodené boli spojenia buniek semenotvorného epitelu, čo spôsobovalo ich uvoľňovanie do lúmenu a štatisticky významný nárast prázdnych miest (P<0,05), ktorý bol však nižší ako v skupine so samostatným podaním selénu (P<0,0001). Výrazné bolo poškodenie spermatíd až ich úplné odlupovanie a strata ich vrstiev do lúmenu, čím sa znižovala výška epitelu a nastal pokles spermatogenézy. Kombinácia diazinonu a selénu znižovala vzájomné samostatné toxické účinky doteraz neznámou interakciou. To je dôležité zistenie pre možnosť zníženia toxicity organofosforečných pesticídov. Podobne **Kashanian et al.**

(2008) uvádzajú ochranné pôsobenie selénu pred škodlivými účinkami diazinonu na DNA týmusu teliat. Sú potrebné ďalšie výskumy na objasnenie danej problematiky.

ZÁVER

Výsledky intraperitoneálneho podania diazinonu ukázali, že spôsobuje výrazné poškodenie semenotvorného epitelu a intersticiálneho tkaniva. Narúša štruktúru až dezintegruje nekrotizovaný semenotvorný epitel, utlmuje až zastavuje spermatogenézu, rozširuje intersticiálne tkanivo, poškodzuje a rozširuje cievy. Takéto poškodenie funkčných tkanív semenníka môže spôsobiť narušenie plodnosti až neplodnosť pri akútnych otravách. Selén po i.p. podaní spôsobuje degeneratívne zmeny v spojení buniek semenotvorného epitelu, narúša jeho celistvosť a štruktúru najmä oddeľovaním spermatíd z epitelu, čím sa priamo narúša spermatogenéza, čo môže viesť k zníženiu plodnosti po akútnom predávkovaní selénom, alebo otravách. Kombinácia intraperitoneálne podaného diazinonu a selénu vykazuje ochranný vplyv selénu voči účinkom diazinonu. Poškodenia po interakcii diazinonu a selénu v organizme sú podobné účinkom samostatne podaného selénu – zmeny celistvosti a štruktúry epitelu, poškodenie a uvoľnenie spermatíd, narušenie spermatogenézy. Ochranné pôsobenie je potrebné ďalej skúmať, sú potrebné ďalšie, najmä biochemické výskumy na objasnenie účinkov a následné využívanie selénu proti škodlivým účinkom diazinonu a potencionálne aj ďalších organofosforečných pesticídov v praxi.

LITERATÚRA

- ABUKABAR, M. G., TAYLOR, A., FERNS, G. A., 2004. The effects of aluminium and selenium supplementation on brain and liver antioxidant status in the rat. In *Afr. J. Biotechnol.*, roč. 3, 2004, č. 1 s. 88-93.
- AKINLOYE, O., AROWOJOLU, A. O., SHITTU, O. B., ADEJUWON, C. A., OSOTIMEHIN, B., 2005. Selenium status of idiopathic infertile Nigerian males. In: *Biol. Trace Elem. Res.*, roč. 104, 2005, č. 1, s. 9-18.
- ALAHYARY, P., POOR, M. I., AZARBAIJANI F. F., NEJATI, V. 2008. The potential toxicity of diazinon on physiological factors in male rat. In *Pak. J. Biol. Sci.*, roč. 11, 2008, č. 1, s. 127-30.
- ATSDR - Agency for toxic substances and disease registry, 2003. Toxicological profile for selenium. U.S. Department of health and human services, 2003. 457 s.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008. Toxicological profile for selenium. U.S. Department of health and human services, 2008. 298 s.
- BOITANI, C., PUGLISI, R., 2008. Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. In *Adv. Exp. Med. Biol.*, roč. 63, 2008, č. 6, s. 65-73.

- CLARK, L. C., DALKIN, B., KRONGRAD, A., COMBS, G. F., TURNBULL, B. W., SLATE, E. H., WITHERINGTON, R., HERLONG, J. H., JANOSKO, E., CARPENTER, D., BOROSSO, C., FALK, S., ROUNDER, J., 1998. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. In *British Journal of Urology*, roč. 81, 1998, č. 6, s. 730-734.
- CHOWDHURY, A. R., VENKATAKRISHNA-BHATT, H., 1983. Effect of selenium dioxide on the testes of rat. In *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, roč. 27, 1983, č. 3, s. 237-240.
- DUTTA, H. M., MEIJER H. J. 2003. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. In *Environ. Pollut.*, roč. 125, 2003, č. 3, s. 355-360.
- EARL, F. L., MELVEGER, B. E., REINWALL, J. E. et al. 1971. Diazinon toxicity--comparative studies in dogs and miniature swine. In *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, roč. 18, 1971, č. 2, s. 285-295.
- EL-DEMERASH, F. M., 2004. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. In *J. Trace Elem. Med. Biol.*, roč. 18, 2004, č. 1, s. 113-121.
- EL-AZIZ, A. M. I., SAHLAB, A. M., EL-KHALIK A. M. 1994. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. In *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, roč. 101, 1994, č. 6, s. 230-232.
- 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.*, roč. 5, 2009, č. 1, s. 51-57.
- EPA - Environmental Protection Agency, 2006. Interim reregistration eligibility decision. Diazinon. Washington, D. C.: U. S. Environmental Protection Agency, 2006.
- FORESTA, C., FLOHÉ, L., GAROLLA, A., ROVERI, A., URSINI, F., MAIORINO, M., 2002. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. In *Biol. Reprod.*, roč. 67, 2002, č. 3, s. 967-971.
- HARRIS, W., SACHANA, M., FLASKOS, J., HARGREAVES, A. J., 2009. Proteomic analysis of differentiating neuroblastoma cells treated with sub-lethal neurite inhibitory concentrations of diazinon: identification of novel biomarkers of effect. In *Toxicol Appl Pharmacol.*, roč. 240, 2009, č. 2, s. 159-165.
- KAORUKO, M., SHUJI, H., KAZUHIKO, H., ATSUKO, S., MOMOKO, CH., YUTAKA, I., 1999. Selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in rat spermatozoa. In *Biomed Res. Trace Elem.*, roč. 10, 1999, č. 1, s. 19-23.
- 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.*, roč. 27, 2008, č. 6, s. 325-332.
- KAUR, R., KAUR, K., 2000. Effects of dietary selenium (SE) on morphology of testis and cauda epididymis in rats. In *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, roč. 44, 2000, č. 3, s. 265-272.
- KESKES-AMMAR, L., FEKI-CHAKROUN, N., REBAI, T., SAHNOUN, Z., GHOZZI, H., HAMMAMI, S., ZGHAL, K., FKI, H., DAMAK, J., BAHLOUL, A., 2003. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. In *Arch. Androl.*, roč. 49, 2003, č. 2, s. 83-94.
- LATENDRESSE, J. R., WARBRITTON, A. R., JONASSEN, H., CREASY, 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.*, roč. 30, 2002, č. 4, s. 524-533.
- MELENDRES, J., SEDIK, L., WESTER, R. C. 1993. Percutaneous absorption of diazinon in humans. In *Food Chem. Toxicol.*, roč. 3, 1993, č. 8, s. 569-572.
- MOZAFARIAN, D., 2009. Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: current evidence and unanswered questions. In *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, roč. 6, 2009, č. 6, s. 1894-1916.
- NEBBIA, C., BRANDO, C., BURDINO, E., RASERO, R., VALENZA, F., ARISIO, R., UGAZIO, G., 1987. Effects of the chronic administration of sodium selenite on rat testes. In *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, roč. 58, 1987, č. 2, s. 183-197.
- OKAMURA, A., KAMIJIMA, M., OHTANI, K., YAMANOSHITA, O., NAKAMURA, D., ITO, Y., MIYATA, M., UHEYAMA, 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.*, roč. 51, 2009, č. 6, s. 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.*, roč. 6, 2009, č. 2, s. 136-145.
- PARSHAD, R. K., SUD, M., 1989. Effect of selenium-rich wheat on rat spermatogenesis. In *Andrologia*, roč. 21, 1989, č. 5, s. 486-489
- 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.*, roč. 202, 2005, č. 2, s. 189-198.
- 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.*, roč. 28, 2008, č. 5, s. 674-680.
- SAFARINEJAD, M. R., SAFARINEJAD, S., 2009. Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo

controlled, randomized study. In *J. Urol.*, roč. 181, 2009, č. 2, s. 741-751.

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.*, roč. 25, 2008, č. 4, s. 455-460.

SARABIA, L., MAURER, I., BUSTOS-OBREGÓN, E., 2009 a). Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. In *Ecotoxicol. Environ. Safety*, roč. 72, 2009, č. 2, s. 663-668.

SARABIA, L., MAURER, I., BUSTOS-OBREGÓN, E., 2009 b). Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. In *Ecotoxicol. Environ. Safety*, roč. 72, 2009, č. 3, s. 938-942.

SHINOHARA, A., CHIBA, M., TAKEUCHI, H., KINOSHITA, K., INABA, Y., 2005. Trace elements and sperm parameters in semen of male partners of infertile couples. In *Nippon Eiseigaku Zasshi.*, roč. 60, 2005, č. 4, s. 418-425.

STRADAIOLI, G., SYLLA, L., MONACI, M., MAIORINO, M., 2009. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. In *Theriogenology*, roč. 72, 2009, č. 1, s.91-98.

SUN, Y., MU, Y., MA, S., GONG, P., YAN, G., LIU, J., SHEN, J., LUO, G., 2005. The molecular mechanism of protecting cells against oxidative stress by 2-selenium-bridged beta-cyclodextrin with glutathione peroxidase activity. In *Biochim. Biophys. Acta*, roč. 17, 2005, č. 3, s. 199-204.

ŠIŠKA, B., TOMAN, R., GOLIAN, J., KRAČÍROVÁ, A., HLUCHÝ, S., 2008. Selenium and diazinon interaction and effect on rat serum cholinesterase activity after intraperitoneal administration. In *Met. Ions Biol. Med.*, roč. 10, 2008, č. 1, s. 615-620.

WOJTCZAK, A., 2003. Selenium as an anticarcinogenic agent. In *Acta Pol. Pharm.*, roč. 60, 2003, č. 3, s. 215-217.

XU, D. X., SHEN, H. M., ZHU, Q. X., CHUA, L., WANG, Q. N., CHIA, S. E., ONG, C. N., 2003. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. In *Mutat. Res.*, roč. 53, 2003, č. 1-2, s. 155-163.

YEHIA, M. A., EL-BANNA, S. G., OKAB, A. B., 2007. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. In *Exp. Toxicol. Pathol.*, roč. 59, 2007, č. 3-4, 215-225.

Práca bola finančne podporená projektom VEGA 1/0568/09.

Kontaktná adresa:

Ing. Michal Cabaj, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, Katedra veterinárskych disciplín, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, tel.: 037 641 4503, E-mail: michal.cabaj@uniag.sk

Hlinku 2, 94976 Nitra

doc. Ing. Róbert Toman, Dr., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, Katedra veterinárskych disciplín, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

Ing. Mária Adamkovičová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, Katedra veterinárskych disciplín, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

doc. MVDr. Peter Massányi, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, Katedra fyziológie živočíchov, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

Ing. Branislav Šiška, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

doc. Ing. Norbert Lukáč, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, Katedra fyziológie živočíchov, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

doc. Ing. Jozef Golian, Dr., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra