

**П. А. Киселев, Н. И. Павлюченко, Е. Г. Попов,
Г. А. Ивко, Н. А. Бовдей, Е. К. Власенко, А. Г. Сыса**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь*

ВЛИЯНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ ФЛУАЗИФОПА, ЦИПЕРМЕТРИНА, ПРОПИКОНАЗОЛА И ИМИДАКЛОПРИДА НА АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P450 МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС

Аннотация

На базе цитохром-P450-монооксигеназного комплекса микросом печени крыс апробирована тест-система оценки и получены новые данные об ингибирующих эффектах пестицидов – флуазифопа, циперметрина, пропиконазола и имidakлоприда. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о перспективности использования микросом печени млекопитающих в качестве модели для экспресс-оценки экологической безопасности вновь создаваемых средств защиты растений. Социально-экономическая значимость предлагаемого метода заключается: а) в снижении экономических затрат за счет меньшего числа требуемых экспериментов на животных; б) в сокращении сроков проведения испытаний на экологическую безопасность; в) в создании предпосылок для направленного поиска пестицидов нового поколения.

Ø Ключевые слова: *цитохром P450, НАДФН-оксидоредуктаза, микросомы печени, флуазифоп, циперметрин, пропиконазол, имidakлоприд.*

Современный этап развития химических средств защиты растений характеризуется возрастанием числа вновь синтезируемых соединений с гербицидной, инсектицидной, фунгицидной и ростостимулирующей активностью, а также с ужесточением требований к экологической и генетической безопасности создаваемых препаратов [1, 2]. Для сокращения финансовых и временных затрат в странах Евросоюза, США и Японии идет интенсивная разработка тест-систем, позволяющих *in vitro* оценить влияние пестицидов на организм человека и животных с использованием в качестве критерия функционально важных биохимических реакций [3]. В нашей лаборатории разработаны и применены тест-системы на основе измерения активности реакций, катализируемых цитохром-P450-монооксигеназными комплексами микросом печени, содержащими два принципиальных фермента: изоформы цитохрома P450 (цит.P450) и его НАДФН-зависимую оксидоредуктазу (ОР) [4, 5]. Эти комплексы участвуют в метаболизме многих токсинов, проканцерогенов, лекарств и других ксенобиотиков, чутко реагируя на их появление в клетке как за счет индукции специфических изоэнзимов цит.P450, так и путем изменения каталитической активности в результате прямого действия чужеродных соединений на белки и липидные компоненты микросом [5–8]. Монооксигеназные системы обоснованно [6, 7] применены нами для оценки действия потенциально биологически-опасных веществ и пестицидов.

Цель настоящего исследования заключалась в апробации тест-системы микросом печени крыс для получения новых данных о действии таких известных средств защиты растений, как флуазифоп, циперметрин, пропиконазол и имidakлоприд, на активность цит.P450, обеспечивающего ряд детоксицирующих функций печени, что перспективно для разработки практических рекомендаций по экспресс-анализу экологической безопасности пестицидов.

Материалы и методы исследования

В работе использованы: трис-(оксиметил)-аминометан (Трис-НCl), глицин и бычий сывороточный альбумин (BSA) (Serva, Германия); NaOH и KOH (Lachema, Чехия); дитиотрейтол (ДТТ), никотинамид-аденидинуклеотид-фосфат восстановленный (НАДФН) (Reanal, Венгрия); фенобарбитал (ФБ), 3-метилхолантрен (МХ), бенз(а)пирен [Б(а)П], дитионит натрия и дезоксихолат натрия (Fluka, Германия); цитохром *c* (цит.*c*) (Boehringer, Германия); 7-этоксикумарин (ЕС) (Sigma, США); реактив Фолина (Анализ X, Беларусь), трихлоруксусная кислота (ТХУ) и другие реактивы – производства РФ, марки «х.ч».

Действующие вещества пестицидов (ДВП) – флуазифоп, циперметрин, пропиконазол и имидаклоприд – на условиях сотрудничества взяты в лаборатории испытания пестицидов Института биоорганической химии НАН Беларуси (заведующий – д.б.н. А. И. Быховец).

Выделение микросом. Для создания тест-систем испытываемых ДВП пестицидов нарабатывали микросомы (табл. 1) печени крыс-самцов трехмесячного возраста массой тела 200 г: а) неиндуцированные (**К**) – использовали в реакциях, где в качестве субстрата применяли 7-этоксикумарин (ЭК); б) индуцированные у животных предварительным введением им внутрибрюшинно метилхолантрена (**МХ**) по 40 мг/кг/сут в косточковом масле в течение двух суток с последующим интервалом без введения двух суток до забоя (с забором крыс в опыт на четвертые сутки после начала введения); в) индуцированные предварительно фенобарбиталом (**ФБ**) внутримышечно (100 мг/кг/сут в течение пяти суток с забором крыс в опыт на шестые сутки) – использовали в опытах, где в качестве субстратов применяли 7-ЭК. **МХ** индуцирует синтез и активность изоформ цит.Р450, ответственных за детоксикацию в том числе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), типа Б(а)П, антрацена, диоксина и других, являющихся, как известно, проканцерогенными веществами, а введением **ФБ** у крыс индуцируется синтез и/или активация тех изоформ цит.Р450, которые отвечают в организме за детоксикацию ксенобиотиков типа химических и лекарственных средств [5–8].

Таким образом, разные виды микросом обеспечивают референтные условия тестирования препаратов. При выделении микросом операции проводили при 4 °С, во всех случаях печень от 3–5 крыс помещалась в среду выделения, транспортировалась во льду и хранилась до выделения микросом. Микросомы выделяли по методу [9]. Печень измельчалась скальпелем на кусочки размером до 5 мм, помещалась в охлажденную до 4 °С среду выделения, а именно в раствор буфера (0,1 М Трис-НCl, 0,1 М KCl, 1,0 мМ ЭДТА, 1,0 мМ ДТТ, pH 7,4), промывалась в небольшом объеме этой среды и затем гомогенизировалась в этом же растворе в ножевом гомогенизаторе MPW-302 (Польша) в течение четырех циклов на максимальной скорости по 15 с, а затем в гомогенизаторе РТ-2 (РФ) с тефлоновым пестиком. Готовился 25 %-ный гомогенат. Ядра и прочее осаждали (6×10^3 g, 20 мин) на центрифуге К-24 (Германия). Фракцию микросом получали на центрифуге УПЦ-35 (Украина) при 1×10^5 g 80 мин. Осадок микросом промывали буферным раствором (0,1 М K_2HPO_4 , 1,0 мМ ЭДТА, pH 7,4), центрифугировали 60 мин при 1×10^5 g, ресуспендировали в буфере (0,01 М Трис-ацетат, 20 %-ный глицерин, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, pH 7,4), замораживали в жидком азоте и хранили при –18 °С. Перед использованием сток-суспензии микросом, как правило, разводили в 100 раз, а затем из разведенного пула использовали в пробу 50 мкл суспензии микросом.

Содержание цит. Р450 определяли методом дифференциальной фотометрии восстановленного дитионитом карбонильного комплекса цит.Р450 [10]. Регистрацию дифференциальных спектров поглощения проводили на автоматическом спектрофотометре Specord UV-VIS (Германия). Концентрации (конц.) цит.Р450 считали, принимая его коэффициент молярной экстинкции равным $91000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрацию белка в образцах микросом определяли методом Лоури и соавт. [11] в модификации, предложенной для мембранных белков [12]. В качестве стандарта использовали BSA.

Активность ОР определяли по методу [13]. Для этого в кварцевую кювету, термостатируемую при 30 °С и содержащую 40 нмоль цит.*c* и 0,1 мкмоль ЭДТА в 2 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,7), вносили микрошприцем испытуемый образец и регистрировали с помощью спектрофотометра Specord UV-VIS переход окисленной формы цит.*c* в восстановленную по возрастанию поглощения при 550 нм. В контрольную кювету образец не вносили. Количество вносимого образца подбирали таким образом, чтобы кинетическая кривая оставалась линейной на протяжении, по крайней мере, 3-х мин, а для расчета активности использова-

лись точки, лежащие на начальном (линейном) участке кривой зависимости количества образовавшегося в результате реакции продукта (цит.с восстановленного) от количества внесенного белка. За 1 Ед. активности принимали количество фермента, катализирующее восстановление 1 мкмоль цит.с в минуту с расчетом восстановленного цит.с, спектрометрически принимая его коэффициент молярной экстинкции равным $21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Определение ферментативной активности цит. P450 по отношению к ЭК проводили по методу [14]. Окисление, а именно *O*-деалкилирование 7-ЭК, проводилось 10 мин в 0,1 М трис-НСl буфере pH 7,2 при 30 °С. Реакцию начинали, внося НАДФН (конечная концентрация 0,1 мМ) в реакционную смесь с микросомами (концентрация цитохрома P450 $\leq 0,3$ нмоль/мл) при концентрации ЕС = $6,7 \times 10^{-5}$ М. Останавливали реакцию добавлением 0,5 мл 0,3 М раствора ТХУ. Концентрацию продукта, т. е. 7-гидроксикумарина (ГК), определяли на флуориметре SFL-1211A (Solar, Беларусь) при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны испускания 455 нм в глицин-NaOH-буфере (1 мл пробы + 3 мл 1,6 М глицин-NaOH + 0,5 мл ТХУ). В ходе работ выяснено, что субстрат 7-ЕС хорошо подходит для оценки активности цит. P450 печени млекопитающих.

Определение ферментативной активности цит. P450 по отношению к Б(а)П проводили по методу [15] с нашими модификациями. При этом окисление Б(а)П осуществляли при 37 °С в буфере (50 мМ трис-НСl, 3 мМ MgCl_2 , pH 7,5) на шейкере Water-Bath-Shaker-375 (Польша) со встряхиванием (30 мин при $V = 200$ с.р.м.; $\text{amp.} = 5$). Реакцию начинали, внося НАДФН (конечная концентрация = 50 мкМ) к реакционной смеси с микросомами при конечной концентрации цитохрома P450 = 0,46 нмоль/мл и Б(а)П = 80 мМ. Останавливали реакцию добавлением 1 мл холодного (4 °С) ацетона. После добавления ацетона вносили 3,25 мл гексана и экстрагировали смесь энергичным встряхиванием в течение 1 мин на шейкере Micro-Shaker-326m (Польша). Из органической фазы отбирали 1 мл образца и экстрагировали 3 мл 1 н. NaOH на шейкере Micro-Shaker-326m при встряхивании в течение 1 мин. Концентрацию продукта – экстрагированного 3-ОН-Б(а)П в щелочной фазе определяли на SFL-1211A при $\lambda_{\text{возб.}} = 396$ нм и $\lambda_{\text{исп.}} = 533$.

Степени ингибирования скоростей реакций (IC_{50}), равные концентрациям испытуемых препаратов, при которых происходит 50 %-ное снижение ферментативной активности цит. P450, измеряли в инкубационных тест-системах микросом с разными концентрациями ДВП и рассчитывали графически.

Анализ результатов проводился стандартными методами вариационной статистики при $n = 9$, а также с помощью программ “SigmaPlot” и “ANOVA”.

Результаты и их обсуждение

Характеристики микросом, полученных в нашей лаборатории, вполне соответствовали таковым у аналогичных препаратов микросом, выделяемых зарубежными специалистами [9–15], (табл. 1).

Таблица 1

Характеристики микросом печени, содержащих цит. P450-ОР-комплекс

Тип микросом	Изученные параметры				
	Концентрация цитохрома P450, нмоль/мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельное содержание цитохрома P450, нмоль/мг белка	Активность НАДФН-цитохрома P450-редуктазы, Ед./мл	Удельная активность НАДФН-цитохрома P450-редуктазы, Ед./мг белка
Контрольные (интактные)	$10,93 \pm 0,30$	$14,70 \pm 0,13$	$0,74 \pm 0,04$	$2,79 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,02$
Метилхолантрен-индуцированные	$27,50 \pm 0,76$	$18,50 \pm 0,16$	$1,49 \pm 0,08$	$8,00 \pm 0,14$	$0,44 \pm 0,05$
Фенобарбитал-индуцированные	$36,80 \pm 1,01$	$26,70 \pm 0,23$	$1,38 \pm 0,07$	$14,30 \pm 0,25$	$0,54 \pm 0,06$

Путь метаболической трансформации субстрата-ксенобиотика с участием ферментной системы цит.Р450-ОР приведен на рис. 1. Она многостадийна и реализуется в гидроксiliрующей детоксикации [6].

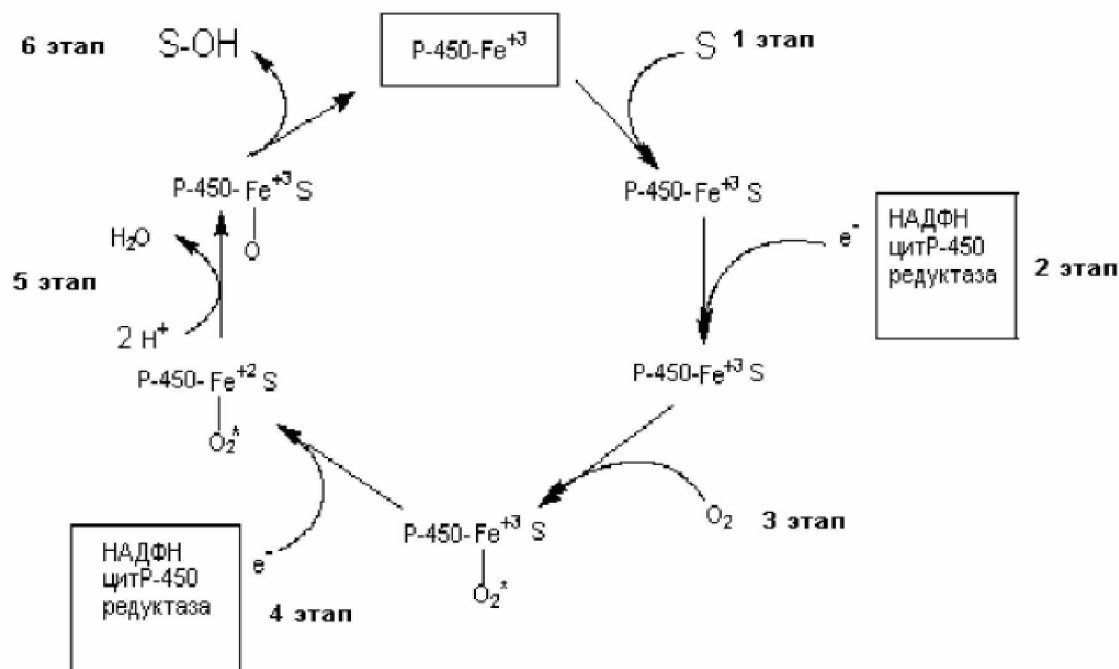


Рис. 1. Схема превращений субстрата-ксенобиотика (S) при участии ферментного комплекса цитохрома Р450-ОР микросом печени млекопитающих [6]

Оценка эффектов ДВП на цит.Р450 с 7-ЭК в тест-системах контрольных и ФБ-индуцированных микросом печени. В реальных экологических условиях живой природы обычно имеет место хронический, или пролонгированный, контакт ксенобиотиков с организмом млекопитающих, что продиктовало необходимость продолжить начатые исследования эффектов пестицидов в опытах на животных с предварительно индуцированным введением **ФБ**, который многократно апробирован для этих целей в экспериментальных работах [6, 8]. Результаты измерений позволили рассчитать значения кинетических параметров реакции **О**-деалкилирования 7-ЭК микросомальным цит.Р450 – величины максимальных скоростей реакции и констант Михаэлиса для неиндуцированного цит.Р450 микросом: $V_{\max} = 99,20 \pm 8,76$ пмоль/мин на нмоль цит.Р450 и $K_m = 33,21 \pm 7,34$ мкМ, а для ФБ-индуцированного цит.Р450: $V_{\max} = 358,43 \pm 6,93$ пмоль/мин на нмоль цит.Р450 и $K_m = 10,25 \pm 0,67$ мкМ. На основании этих расчетов, согласно общепринятому подходу [3, 6, 14], при оценке эффектов ДВП на цит.Р450 субстрат, т.е. 7-ЭК вносили, в тест-систему инкубации так, чтобы его конечная концентрация в начале реакции равнялась значениям $\sim K_m$: 33- и 10- $\times 10^{-6}$ М соответственно. Далее изучили, как изменяется скорость реакции **О**-деалкилирования 7-ЕС цитохромом Р450 в зависимости от концентрации вносимого в среду инкубации ДВП при использовании в тест-системе микросом печени контрольных (неиндуцированных) и предварительно активированных индуктивным воздействием ксенобиотика фенотербитала.

Предлагаемый метод экспресс-оценки токсичности ДВП имеет преимущества – надежность и относительную простоту, что проиллюстрировано на рис. 2, где показано, как определяется эффект препарата на цитохром Р450. Характерно, что полное подавление активности цит.Р450 не достигается даже при высоких концентрациях тестируемых ДВП. Это указывает на неконкурентный опосредованный характер механизма действия ДВП. Нами установлено и угнетающее действие ДВП на активность НАДФН-оксидоредуктазы (данные не приводятся).

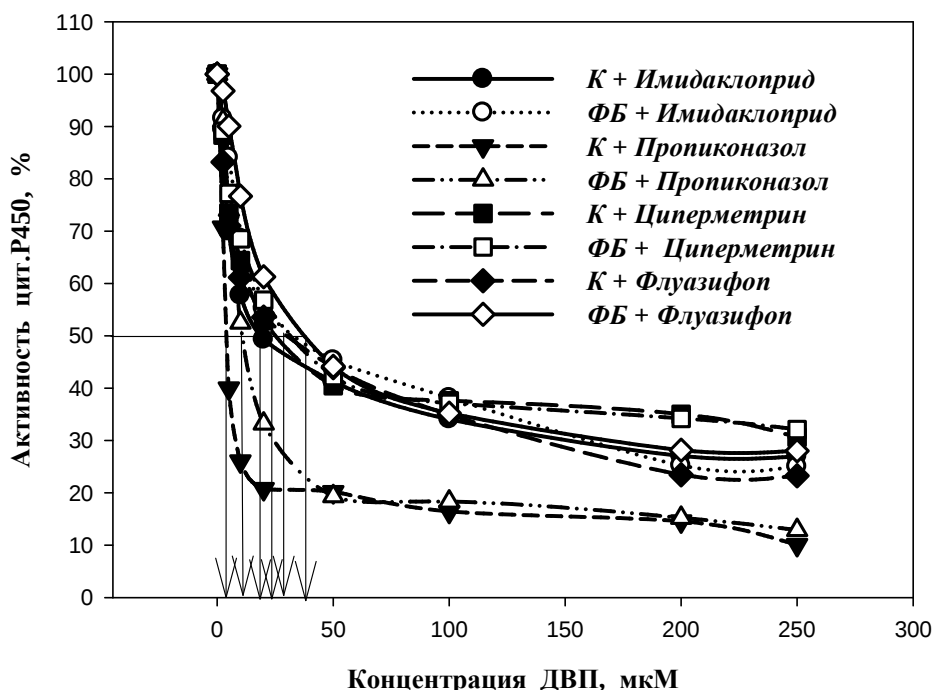


Рис. 2. Определение IC_{50} разных ДВП для неиндуцированных (К) и ФБ-индуцированных цит.Р450-ОР тест-систем в реакции О-деалкилирования 7-ЭК

Результаты оценки эффектов ДВП свидетельствуют о достоверном ингибировании ими активности системы детоксикации организма млекопитающих, представленной цит.Р450-ОР-комплексом микросом печени. Полученные данные суммированы в табл. 2.

Таблица 2

Эффекты ДВП на величины степени ингибирования (IC_{50}) цит.Р450-активности

Препарат	Флуазифоп	Циперметрин	Пропиконазол	Имидаклоприд
IC_{50} , мкМ	$33,03 \pm 2,45$	$28,62 \pm 2,68$	$6,88 \pm 0,90$	$24,77 \pm 2,34$

Как видим, величины степени ингибирования (IC_{50}) флуазифопом, циперметрином и имидаклопридом сходны (различия в пределах 11–24 %), в то время как пропиконазол проявил себя наиболее опасно, т.к. его цитохром-ингибирующая активность $\sim$ в 5 раз выше, чем остальных исследованных ДВП.

Оценка эффектов ДВП на цит.Р450 по реакции окисления Б(а)П в тест-системах МХ-индуцированных микросом печени. Важность данного раздела работы проистекает из соображений практической безопасности ввиду систематического нарастания степени загрязнения окружающей среды обитания человека от техногенных источников экологически неблагоприятными ПАУ с проканцерогенной активностью, к числу которых относится и Б(а)П [3–7]. Для оценки эффектов ДВП на цит.Р-450-гидроксилирующую активность Б(а)П использовали модель МХ-индуцированных микросом.

Оптимизация при построении калибровок тест-системы потребовала подобрать приемлемые условия анализа для оценки активности пестицидов в тест-системе с метилхолантрен-индуцированными микросомами печени. Для этого предварительно выяснили, каковы зависимости параметров реакции гидроксилирования Б(а)П цит.Р450-ОР-комплексом от концентрации белка цит.Р450, от длительности времени инкубации и концентрации субстрата.

Отработка условий оптимального анализа определила приемлемые концентрацию цит.Р450-белка (~ 10 – 40 нМ) и длительность проведения реакции, а именно интервал в 20 мин, обеспечивающие полноту процесса тестирования активности микросомной цитохром-монооксигеназной системы детоксикации ксенобиотиков. Измерения активности цит.Р450

дают расчетные значения для неиндуцированных (контрольных) микросом: $V_{\max} = 44,57 \pm 1,24$ пмоль/мин на нмоль цит.Р450 и $K_m = 2,90 \pm 0,27$ мкМ, а для *МХ*-индуцированных: $V_{\max} = 162,83 \pm 5,40$ пмоль/мин на нмоль цит.Р450 и $K_m = 0,86 \pm 0,11$ мкМ.

В последующем, согласно общепринятому подходу [3, 6, 14], при оценке эффектов на цит.Р450 действующих веществ пестицидов Б(а)П вносили в систему *МХ*-индуцированных микросом так, чтобы его конечная концентрация в начале инкубации равнялась $1,0 \times 10^{-6}$ М, что соответствует K_m .

Реакция 3-ОН-гидроксилирования Б(а)П (рис. 3) в отличие от окисления ЭК катализируется уже иным каталитическим центром и др. изоформами цит.Р450 [5, 8, 15], – она более устойчива к ингибирующему действию ДВП. Здесь для достижения 50 %-ной степени ингибирования фермента требовались концентрации ДВП примерно на порядок выше. Причем и спектр активности пестицидов изменился. Наибольшую ингибирующую активность в отношении данной реакции проявил уже не пропиконазол, а циперметрин. Ингибирующие активности флуазифопа и имидаклоприда были соответственно в 2–3 раза ниже, чем циперметрина. То, что ДВП проявили себя как ингибиторы детоксикации Б(а)П, – важный факт, указывающий на повышение вероятности канцерогенеза при их попадании в организм теплокровных.

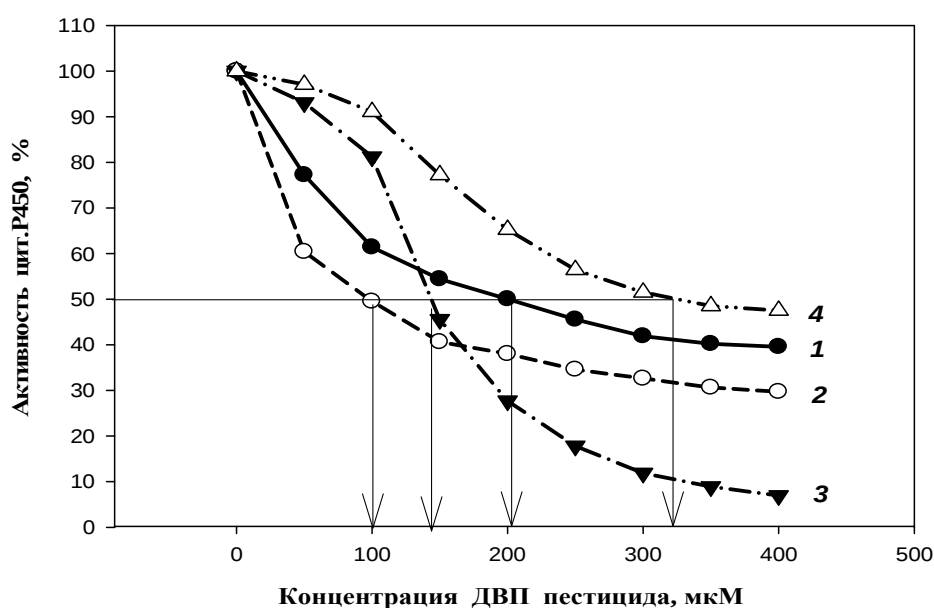


Рис. 3. Определение для *МХ*-индуцированного цитохрома Р450 степеней ингибирования (IC_{50}) катализируемой им реакции гидроксилирования Б(а)П ДВП: 1) флуазифопом ($IC_{50} = 200,16 \pm 14,85$ мкМ), 2) циперметрином ($IC_{50} = 100,08 \pm 9,37$ мкМ), 3) пропиконазолом ($IC_{50} = 144,56 \pm 10,72$ мкМ), 4) имидаклопридом ($IC_{50} = 322,48 \pm 23,92$ мкМ)

Выводы

1. Полученные новые данные о влиянии средств защиты растений, а именно, действующих веществ пестицидов флуазифопа, циперметрина, пропиконазола, имидаклоприда, указывают на их ингибирующие эффекты в отношении метаболической и детоксицирующей активности цитохром-Р-450-монооксигеназных систем микросом печени млекопитающих.

2. Измерение эффектов ДВП на цитохром Р450 *in vitro* пригодно для первичной количественной характеристики биологической и экологической токсичности пестицидов в отношении теплокровных.

3. Использование цитохром-Р-450-монооксигеназных комплексов микросом печени млекопитающих перспективно в качестве тест-систем для экспресс-оценки экологической безопасности вновь создаваемых средств защиты растений, т.к. такие тест-системы обеспечивают снижение числа экспериментов на животных, сокращение сроков проведения испытаний

и создают предпосылки для направленного поиска пестицидов нового поколения, в том числе природных аналогов.

Список литературы

1. Лахвич, Ф. А. Биорегуляторы: лечебные и диагностические препараты. Химические средства защиты растений / Ф. А. Лахвич // Наука народному хозяйству. – Минск : Право, 2002. – С. 611–615.
2. Ключков, А. В. Перечень пестицидов, предлагаемых к продаже в Республике Беларусь в 2003 году / А. В. Ключков // Земляробства і ахова раслін. – 2003. – № 2. – С. 43–45.
3. Combes, R. D. The use of artificial intelligence systems for predicting toxicity / R. D. Combes, P. Judson // Pesticide Sci. – 1995. – Vol. 45, № 1. – P. 179–194.
4. Разработка подходов для экспресс-оценки экологической безопасности пестицидов / П. А. Киселев [и др.] : тез. докл. 6-й Междунар. научн. конф. “Сахаровские чтения 2006 года: экологические проблемы XXI века” – Минск : УП «Бест-принт», 2006. – Ч. I. – С. 218–220.
5. Kisselev, P. A. Epoxidation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by μ CYP1A1 in reconstituted membranes. Effects of charge and nonbilayer phase propen of the membrane / P. A. Kisselev, D. A. Schwarz, K. L. Platt // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269, № 7. – P. 1799–1805.
6. Метелица, Д. И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов / Д. И. Метелица. – Минск : Наука и техника, 1984. – 293 с.
7. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility / K. Kawajiri [et al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 1993. – Vol. 14, № 1. – P. 77–87.
8. Ляхович, В. В. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков / В. В. Ляхович, И. Б. Цырлов. – Новосибирск : Наука, 1981. – 242 с.
9. Hoeven, T. A. Preparation and properties of partially purified cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase from rabbit liver microsomes / T. A. Hoeven, M. J. Coon // J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249, № 19. – P. 6302–6310.
10. Omura, T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes / T. Omura, R. Sato // J. Biol. Chem. – 1964. – Vol. 239, № 6. – P. 2379–2385.
11. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 93, № 1. – P. 265–275.
12. Данн, М. Биохимическое исследование мембран / М. Данн, Э. Мэдди. – М. : Мир, 1979. – С. 219–220.
13. Vermilion, J. L. Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase / J. L. Vermilion, M. J. Coon // J. Biol. Chem. – 1978. – Vol. 253, № 8. – P. 2694–2704.
14. Aitio, A. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarine deethylation / A. Aitio // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 85 N 2. – P. 488–491.
15. Nebert, D. W. Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture / D. W. Nebert, H. V. Gelboin // J. Biol. Chem. – 1968. – Vol. 243, № 23. – P. 6242–6249.

***P. A. Kisselev, N. I. Pavluchenko, E. H. Popoff,
G. A. Ivko, E. K. Vlasenko, N. A. Bovdey, A. G. Sysa***

ASSESSMENT OF PESTICIDES' ECOLOGICAL BIOSAFETY USING BIOCHEMICAL MODEL OF RAT LIVER CYTOCHROME P450 MICROSOMES

Prolonged and postponed inhibiting effects of acting pesticides' substances (APSs, – fluazifop, cypermethrin, propiconazole and imidacloprid, were studied using biochemical model of constitutive and induced cytochrome P450 in liver microsomal system of rats. The method provides express-assessments of pesticides' ecological effects for a number of APSs and very perspective because of reducing expenses in number of experiments, animals and terms of tests needed for biosafety expertise.