



Экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака в сверхмалых дозах на модели острого каррагенинового воспаления

© Махмудова О. А.¹, Авхадиева Г. Ф.¹, Хазиахметова В. Н.¹, Никитин Д. О.², Семина И. И.²

¹ — ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация

² — ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Лекарственное загрязнение окружающей среды представляет собой глобальную экологическую проблему современности. Увеличение потребления лекарственных средств напрямую влияет на уровень загрязнения различных экосистем, включая водные ресурсы. Недостаточная эффективность существующих методов очистки сточных вод от лекарственных средств приводит к лекарственному загрязнению водных объектов и требует изучения влияния сверхмалых доз лекарственных средств на организм человека и животных. В пробах поверхностных вод г. Казани было обнаружено нестероидное противовоспалительное средство — диклофенак в концентрации 1×10^{-9} М.

Цель данного исследования — изучение наличия специфических фармакологических эффектов у диклофенака, обнаруженного в пробах воды в сверхмалых дозах на экспериментальных моделях патологических процессов.

Методы. В эксперименте были использованы 21 самец белой лабораторной мыши, которых поделили на три группы (в каждой по 7 мышей). В течение 4 дней мышам внутрижелудочно были введены дистиллированная вода (контрольная группа), раствор диклофенака 1×10^{-6} М (экспериментальная группа № 1), раствор диклофенака 1×10^{-9} М (экспериментальная группа № 2). На пятый день эксперимента было вызвано воспаление с помощью инъекции каррагенина-лямбда (1 %, Sigma) субплантарно в правую заднюю лапу в объеме 0,05 мл. Величину отека определяли на плетизмометре IITC Life Science (США).

Результаты экспериментального изучения специфической фармакологической активности диклофенака показали, что диклофенак в сверхмалых дозах $0,32 \times 10^{-3}$ мг на 100,0 г массы способен снижать выраженность острого воспаления, вызванного субплантарным введением каррагенина и вызывать НПВС-ассоциированную гастропатию у мышей.

Вывод. Полученные данные, вероятно, свидетельствуют о потенциальном риске неблагоприятного действия лекарственного загрязнения окружающей среды диклофенаком даже в сверхмалых концентрациях.

Ключевые слова: лекарственное загрязнение окружающей среды; каррагениновое воспаление; сверхмалые дозы диклофенака; НПВС-гастропатия у мышей

Для цитирования:

Махмудова О. А., Авхадиева Г. Ф., Хазиахметова В. Н., Никитин Д. О., Семина И. И. Экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака в сверхмалых дозах на модели острого каррагенинового воспаления. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):20–25. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-20-25>. EDN: GNQFQA

Поступила: 28.05.2024. В доработанном виде: 11.06.2024. Принята к печати: 23.06.2024. Опубликовано: 30.06.2024.

Experimental study of the anti-inflammatory activity of diclofenac in ultra-low doses on a model of acute carrageenan inflammation

© Odina A. Makhmudova¹, Guzyal F. Avkhadiyeva¹, Veronika N. Khaziakhmetova¹, Dmitry O. Nikitin², Irina I. Semina²

¹ — Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

² — Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

Abstract

Relevance. Drug pollution of the environment is a global environmental problem of our time. Increased consumption of medicines directly affects the level of pollution of various ecosystems, including water resources. The insufficient efficiency of existing methods for treating wastewater from drugs leads to drug pollution of water bodies and requires studying the effect of ultra-low doses of drugs on the human body and animals. A non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac, was detected in surface water samples in Kazan at a concentration of 1×10^{-9} M.

The purpose of this study is to study the presence of specific pharmacological effects of diclofenac detected in water samples in ultra-low doses in experimental models of pathological processes.

Methods. The experiment used 21 male white laboratory mice, which were divided into three groups (each with 7 mice). For 4 days, mice were intragastrically injected with distilled water (control group), diclofenac solution 1×10^{-6} M (experimental group No. 1), diclofenac solution 1×10^{-9} M (experimental group No. 2). On the fifth day of the experiment, inflammation was induced by injecting carrageenan lambda (1 %, Sigma) subplantarily into the right hind paw in a volume of 0.05 ml. The amount of edema was determined using an IITC Life Science plethysmometer (USA).

The results of an experimental study of the specific pharmacological activity of diclofenac showed that diclofenac in ultra-low doses of 0.32×10^{-3} mg per 100.0 g of weight is able to reduce the severity of acute inflammation caused by subplantar injection of carrageenan and to cause NSAID-associated gastropathy in mice.

Conclusion. The obtained data likely indicate a potential risk of adverse effects from drug contamination of the environment with diclofenac, even in ultra-low concentrations.

Keywords: drug pollution of the environment; carrageenan inflammation; ultra-low doses of diclofenac; NSAID gastropathy in mice

For citations:

Makhmudova OA, Avkhadieva GF, Khaziakhmetova VN, Nikitin DO, Semina II. Experimental study of the anti-inflammatory activity of diclofenac in ultra-low doses on a model of acute carrageenan inflammation. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = Pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2024;(2):20–25. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-20-25>. EDN: GNOFQA

Received: 28.05.2024. **Revision received:** 11.06.2024. **Accepted:** 23.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

Ежегодно во всём мире назначается и используется большое количество лекарственных средств. В 2023 году объём мирового фармацевтического рынка составил 1,6 триллиона долларов США, для сравнения в 2013 году мировой фармацевтический доход составлял 994 миллиарда долларов США [1]. Объём фармацевтического рынка Российской Федерации в 2023 году составил 2 573 миллиарда рублей, для сравнения в 2013 году эта цифра составляла 1 122 миллиарда рублей [2]. До 50 % приобретённых лекарственных средств остаются неиспользованными и в результате ненадлежащей утилизации попадают в окружающую среду, что может иметь опасные последствия [3]. Основным источником лекарственных средств в окружающей среде являются сточные воды. Станции очистки сточных вод не предназначены для удаления фармацевтических отходов, это приводит к выбросам лекарственных средств в неизменённом или метаболитизированном виде в реки или другие крупные водоёмы [4]. Научных исследований потенциальной токсичности смесей лекарственных остатков недостаточно, но тем не менее установлено, что лекарственное загрязнение окружающей среды представляет высокий экологический риск во всем мире [5]. Наиболее часто в окружающей среде обнаруживают производные эстрогенов, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), антибактериальные средства, антидепрессанты и лекарственные средства, используемые для лечения сахарного диабета [6]. НПВС — являются вторыми, после эстрогенов, по значимости лекарственными загрязнителями. По данным исследований образцов воды в 50 странах мира, диклофенак является наиболее часто обнаруживаемым НПВС в образцах окружающей среды в концентрациях 0,032–18,74 мкг/л [7–9]. Несмотря на то, что концентрации НПВС в пресной воде можно считать относительно низкими, их высокая биологическая активность может представлять серьёзный риск и вызывать токсические эффекты у животных [10]. В эксперименте по изучению острой и хронической токсичности диклофенака и других НПВС на *Daphnia magna*, смерть ракообразных наступила спустя 24 ч после воздействия диклофенака в максимальной концентрации 486 мг/л и ибупрофена в концентрации 200 мг/л. Воздействие диклофенака

в концентрации 123,3 мг/л вызвало 50 % смертность (EC_{50}) у *D. magna* [11].

В проведённых нами ранее исследованиях проб поверхностных вод из трёх источников (оз. Нижний Кабан, р. Казанка, р. Волга) г. Казани методами ПФИА (поляризационный флуоресцентный иммуноанализ) и амперометрического иммуносенсора было показано содержание диклофенака на уровне $(0,84–6,50) \times 10^{-9}$ М или 0,3–1,9 нг/мл [12]. Полученные результаты вызвали интерес для дальнейшего изучения наличия специфической фармакологической активности диклофенака в сверхмалых дозах. Таким образом, целью нашего исследования было экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака и наличие ulcerогенного действия в сверхмалых дозах при лечебно-профилактическом введении внутрь при моделировании острого каррагенинового воспаления.

Материалы и методы/ Materials and methods

Эксперименты проведены на 21 белых мышах-самцах, массой 38–55 г. Лабораторные животные были получены из питомника Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». До начала эксперимента все животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной диете в соответствии с Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), а также с Правилами надлежащей лабораторной практики, утверждёнными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Казанского (Приволжского) федерального университета.

Влияние сверхмалых доз диклофенака на острое воспаление, вызванное введением каррагенина / The effect of ultra-low doses of diclofenac on acute inflammation caused by carrageenan administration

Животные были разделены на три группы: контрольная группа (7 мышей) получала дистиллированную воду 1,0 мл на 100,0 г массы животного, экспериментальная группа № 1 (7 мышей) получала раствор

диклофенака в концентрации 1×10^{-6} М (моль/л) — 1,0 мл раствора на 100,0 г массы животного, экспериментальная группа № 2 (7 мышей) — раствор диклофенака в концентрации 1×10^{-9} М (моль/л) — 1,0 мл раствора на 100,0 г массы животного. Вводимые дозы для экспериментальной группы № 1 (1×10^{-6} М) составила $0,32 \times 10^{-3}$ мг на 100 г массы, для экспериментальной группы № 2 (1×10^{-9} М) — $0,32 \times 10^{-6}$ мг на 100,0 г массы мыши. Воду и растворы диклофенака вводили внутривентрикулярно из расчёта 1,0 мл раствора на 100,0 г массы животного один раз в день в течение четырёх дней до введения каррагинина и спустя 12 часов после введения каррагинина. На четвёртый день эксперимента мышей лишили еды, питьевая вода была в неограниченном количестве. Во время эксперимента, помимо показателей отёка, следили также за динамикой массы. Достоверность в изменении массы тела не была выявлена.

Для моделирования острого каррагининового воспаления использовали общепринятую модель воспаления — инъекцию каррагинина-лямбда (1 %, Sigma) субплантарно в правую заднюю лапу в объёме 0,05 мл. Введение каррагинина производили на четвёртый день после начала введения экспериментальных растворов. Величину отёка определяли на плетизмометре ИТС Life Science (США) по разности объёмов лапы до введения провоспалительного агента (каррагинина) и после его введения — через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 ч. Результаты по динамике отёчной реакции представлены в % прироста объёма лап мышей относительно их исходного объёма (до введения каррагинина).

Изучение желудков мышей на наличие НПВС-гастропатии после введения сверхмалых доз диклофенака / Study of mouse stomachs for the presence of NSAID gastropathy after administration of ultra-low doses of diclofenac

Спустя 12 часов после последнего введения воды и растворов диклофенака провели декапитацию мышей под лёгким эфирным наркозом с помощью гильотины (НПО «Открытая наука», Россия), извлекли желудки,

разрезали по малой кривизне, промыли 0,9 % раствором NaCl и провели макроскопическую оценку слизистой оболочки желудка. Подсчитали общее число повреждений на желудок (язвенные дефекты, число эрозий и геморрагий).

Статистический анализ был выполнен с помощью MS Excel 2019. Данные по изменению интенсивности отёков лап, число повреждений слизистой оболочки желудков оценивали по методу t-критерий Стьюдента (двухвыборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Влияние сверхмалых доз диклофенака на острое воспаление, вызванное введением каррагинина / The effect of ultra-low doses of diclofenac on acute inflammation caused by carrageenan administration

Субплантарная инъекция каррагинина к первому часу развития воспалительной реакции вызвала увеличение лапы мышей в среднем в контрольной группе на 83 % с максимальным развитием отёка через 6 часов — 206 % по сравнению с исходным объёмом — до введения каррагинина (таб.).

В экспериментальной группе № 1 максимальный отёк развился на сроке 5 часов и составлял 105 % от исходной величины. Внутривентрикулярное введение раствора диклофенака (1×10^{-6} М) приводило к статистически значимому снижению величины отёка по сравнению с группой контроля на сроках 1, 2, 3, 6 часов на 50 %, 86 %, 65 %, 111 %, соответственно (таб.).

В группе № 2 максимального объёма отёк лапы достиг на сроке 5 часов и составлял 67 % от величины объёма лапы до введения каррагинина. Внутривентрикулярное введение раствора диклофенака (1×10^{-6} М) способствовало статистически значимому снижению величины отёка по сравнению с группой контроля на всех сроках наблюдения: на сроках 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 часов на 80 %, 103 %, 83 %, 136 %, 113 %, 175 %, 80 %, 76 %, соответственно, и большему снижению величины отёка по сравнению с группой № 1 (1×10^{-6} М диклофенака) через 6 часов после введения каррагинина — на 64 % (рис.).

Таблица

Число повреждений (эрозии, язвы) слизистой желудков мышей на фоне 5-дневного лечебно-профилактического внутривентрикулярного введения раствора диклофенака 1×10^{-6} М (группа 1), раствора диклофенака 1×10^{-9} М (группа 2) по сравнению с контролем (вода дистиллированная)

Table

The number of damages (erosions, ulcers) to the gastric mucosa of mice during a 5-day treatment and prophylactic intragastric administration of diclofenac solution 1×10^{-6} М (group 1), diclofenac solution 1×10^{-9} М (group 2) compared with control (distilled water)

Показатель	Контроль (H ₂ O) (n = 7)	Группа 1 (диклофенак 1×10^{-6}) (n = 7)	p Контроль и группа 1	Группа 2 (диклофенак 1×10^{-9}) (n = 7)	p Контроль и группа 2	p Группа 1 и группа 2
Число повреждений	16,14 ± 8,14	34,14 ± 12,76	0,007*	49,29 ± 9,34	0,00001*	0,0186^

Примечания: * — $p < 0,05$ — статистически значимые отличия по сравнению с группой контрольных мышей; ^ — $p < 0,05$ — статистически значимые отличия в сравнении между группой 1 и группой 2.

Notes: * — $p < 0.05$ — statistically significant differences compared to the group of control mice; ^ — $p < 0.05$ — statistically significant differences in comparison between group 1 and group 2.

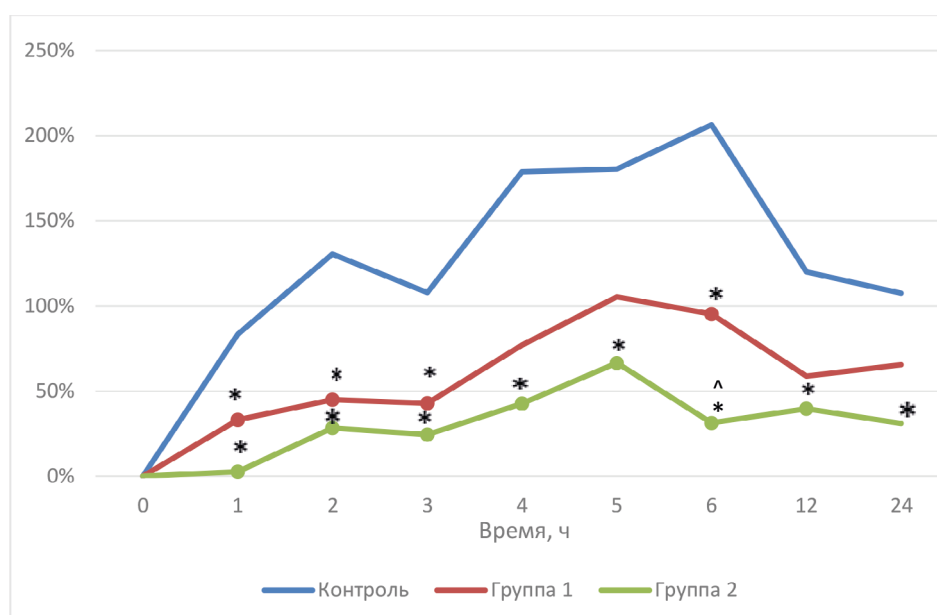


Рис. Интенсивность отёка лап мышей, вызванного субплантарным введением 1 % геля каррагинина, на фоне 5-дневного лечебно-профилактического внутрижелудочного введения раствора диклофенака 1×10^{-6} М (группа № 1), раствора диклофенака 1×10^{-9} М (группа № 2) и дистиллированной воды (контроль) (% прироста объёма лап, $n = 7$)

Fig. The intensity of swelling of the paws of mice caused by subplantar injection of 1 % carrageenan gel against the background of 5 days of therapeutic and prophylactic intragastric administration of diclofenac solution 1×10^{-6} M (group 1), diclofenac solution 1×10^{-9} M (group 2) and distilled water (control) (% increase in paw volume, $n = 7$)

Примечания: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^ — $p < 0,05$ по сравнению с группой 1.

Notes: * — $p < 0.05$ compared to the control; ^ — $p < 0.05$ compared to group 1.

Таким образом, диклофенак в сверхмалых дозах $0,32 \times 10^{-3}$ мг/кг и $0,32 \times 10^{-6}$ мг/кг проявляет выраженное противовоспалительное действие на модели острого каррагининового воспаления у мышей. Установленная специфическая противовоспалительная активность диклофенака в концентрациях, которые были обнаружены в пробах поверхностных вод, свидетельствует о сохранении фармакологической активности диклофенака, попадающего в окружающую среду, что потенциально может приводить к неблагоприятным последствиям.

Изучение слизистой желудков мышей на наличие НПВС-гастропатии после введения водного раствора диклофенака в сверхмалых дозах на фоне острого каррагининового воспаления / Examination of the gastric mucosa of mice for the presence of NSAID gastropathy after administration of an aqueous solution of diclofenac in ultra-low doses against the background of acute carrageenan inflammation

При макроскопическом осмотре слизистой желудков мышей контрольной группы (дистиллированная вода) значительных изменений выявлено не было: слизистая была бледно розового цвета, с умеренно выраженными складками, единичные геморрагии.

При осмотре слизистой желудков экспериментальной группы № 1 (1×10^{-6} М раствор диклофенака) наблюдалось значительное истончение стенок желудков, увеличение объёма желудков, множественные точечные и сливные геморрагии, заметны очаги чёрного цвета, большое количество язвенных дефектов, равномерно распределённых по всей слизистой. Общее количество повреждений достоверно превышало количество повреждений контрольной группы (табл.).

При осмотре слизистой желудков экспериментальной группы № 2 (1×10^{-9} М раствор диклофенака) наблюдалась гипертрофия желудочных складок, множественные точечные и сливные геморрагии, большое количество язвенных дефектов, равномерно распределённых по всей слизистой. Отличительной особенностью желудков мышей этой группы был небольшой размер желудков. Общее количество повреждений достоверно превышало количество повреждений контрольной группы и экспериментальной группы № 1 (см. табл.).

Таким образом, диклофенак в сверхмалых дозах $0,32 \times 10^{-6}$ мг/кг и $0,32 \times 10^{-9}$ мг/кг при внутрижелудочном введении в течение 5 дней на фоне острого каррагининового воспаления оказывал выраженное ульцерогенное действие на слизистую оболочку желудков мышей.

Выводы/ Conclusions

При изучении наличия специфического фармакологического эффекта диклофенака в концентрациях, обнаруженных в пробах поверхностных вод г. Казани (оз. Нижний Кабан, р. Казанка, р. Волга), было установлено выраженное противовоспалительное действие диклофенака в сверхмалых дозах $0,32 \times 10^{-3}$ мг на 100 г массы (1×10^{-6} моль/л) и $0,32 \times 10^{-6}$ мг на 100 г массы

(1×10^{-9} моль/л). Введение диклофенака способствовало статистически значимому снижению выраженности острого воспаления, вызванного субплантарным введением каррагинена, а также вызывало НПВС-ассоциированную гастропатию у мышей. Полученные данные, вероятно, свидетельствуют о потенциальном риске неблагоприятного действия лекарственного загрязнения окружающей среды диклофенаком даже в сверхмалых концентрациях.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Махмудова О. А. — проведение эксперимента, подготовка текста рукописи, статистическая обработка экспериментальных данных; *Авхадиева Г. Ф.* — поиск и анализ литературных источников, подготовка лабораторных мышей к эксперименту; *Хазиахметова В. Н.* — разработка концепции и дизайна исследования, планирование эксперимента, проведение эксперимента, утверждение рукописи для публикации; *Никитин Д. О.* — проведение эксперимента, редактирование текста; *Семина И. И.* — редактирование текста, утверждение рукописи для публикации. Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' participation

Makhmudova OA — conducting an experiment, preparing the text of the manuscript, statistical processing of experimental data; *Avkhadieva GF* — search and analysis of literary sources, preparation of laboratory mice for the experiment; *Khaziakhmetova VN* — developing the concept and design of the study, planning the experiment, conducting the experiment, approving the manuscript for publication; *Nikitin DO* — conducting the experiment, editing the text; *Semina II* — editing the text, approving the manuscript for publication. All the authors have read the final version of the manuscript and agreed with it.

Funding

The study was performed without external funding.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Махмудова Одина Алишеровна

Автор, ответственный за переписку

Аспирант 3-го года обучения, ассистент кафедры внутренних болезней Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация
e-mail: odina_24@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5215-6539>

Odina A. Makhmudova

Corresponding author

Post-graduate student, Assistant, Chair of Internal Diseases, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation
e-mail: odina_24@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5215-6539>

Авхадиева Гузьяль Фанисовна

Студент 6-го курса Лечебного дела Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-5518-4101>

Guzyal F. Avkhadieva

Student, 6 course, General medicine, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-5518-4101>

Хазиахметова Вероника Николаевна

к. м. н., доцент кафедры внутренних болезней Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация; ГАУЗ «Городская поликлиника №7», Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2458-283X>

Veronika N. Khaziakhmetova

PhD, Cand. Sci. (Med.), Chair of Internal Diseases, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation; City clinic №7, Kazan, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2458-283X>

Никитин Дмитрий Олегович

Ассистент кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Dmitry O. Nikitin

Assistant of the Department of Pharmacology, FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Семина Ирина Ивановна

д. м. н., профессор кафедры фармакологии, заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

Irina I. Semina

Dr. Sci (Med.), Professor of the Department of Pharmacology, Head of the Central Research Laboratory, FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

Список литературы / References

1. Pharmacokinetica.ru [Internet] Mikulic M. Global pharmaceutical industry—statistics & facts. [updated 2024 January10; cited 2024 May 9]. Available from: www.statista.com/topics/1764/global-pharmaceutical-industry.
2. Statista.com [Internet] Фармацевтический рынок в России: объём и стоимость в 2017–2022 гг. [updated 2024 February 10; cited 2024 May 9]. Available from: <https://www.statista.com/statistics/1127319/pharmaceutical-market-value-russia/>
3. Alnahas F, Yeboah P, Fliedel L, et al. Expired Medication: Societal, Regulatory and Ethical Aspects of a Wasted Opportunity. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 27;17(3):787. doi: 10.3390/ijerph17030787.
4. Petrovic M, Solé M, López de Alda MJ, Barceló D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem*. 2002 Oct;21(10):2146–56. doi: 10.1002/etc.5620211018.
5. García-Camero JP, Corpa C, Lucena MA, et al. Presence of diclofenac, estradiol, and ethinylestradiol in Manzanares River (Spain) and their toxicity to zebrafish embryo development. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021 Sep;28(36):49921–49935. doi: 10.1007/s11356-021-14167-z.
6. de Rezende AT, Mounteer AH. Ecological risk assessment of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian surface waters. *Environ Pollut*. 2023 Dec 1;338:122628. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122628.

7. Brun GL, Bernier M, Losier R, et al. Pharmaceutically active compounds in atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ Toxicol Chem*. 2006 Aug;25(8):2163–76. doi: 10.1897/05-426r.1.
8. Komori K, Suzuki Y, Minamiyama M, Harada A. Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk. *Environ Monit Assess*. 2013 Jun;185(6):4529–36. doi: 10.1007/s10661-012-2886-4.
9. Zhao JL, Ying GG, Liu YS, et al. Occurrence and a screening-level risk assessment of human pharmaceuticals in the Pearl River system, South China. *Environ Toxicol Chem*. 2010 Jun;29(6):1377–84. doi: 10.1002/etc.161.
10. Acuña V, Ginebreda A, Mor JR, et al. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environ Int*. 2015 Dec;85:327–33. doi: 10.1016/j.envint.2015.09.023.
11. Du J, Mei CF, Ying GG, Xu MY. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2016 Jul;97(1):84–90. doi: 10.1007/s00128-016-1806-7.
12. Medyantseva EP, Gazizullina ER, Brusnitsyn DV, et al. Immunochemical Determination of Diclofenac in Tablets, Artificial Urine, and Surface Water Using Ruthenium and Rhenium Complexes. *Pharm Chem J*. 2023;57(4):573–577. doi: 10.1007/s11094-023-02922-0.