

Protective Effects of Simvastatin on Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Gingival Fibroblasts Cells Exposed to Venlafaxine

Sina Kuestani¹,
Mohammad Shokrzadeh²,
Shaghayegh Aghajanshakeri³,
Shaghayegh Shokrzadeh⁴

¹ Pharmacy Student, Ramsar International Branch, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

² Professor, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Medical Student, Ramsar International Branch, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

(Received July 5, 2020 ; Accepted January 18, 2022)

Abstract

Background and purpose: Venlafaxine is an antidepressant that belongs to the family of selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor (SNRIs) drugs. Recent studies have indicated that prolonged use of antidepressants leads to a state where increased formation of reactive oxygen species (ROS) overwhelms body antioxidant protection and subsequently induces DNA damage, lipid peroxidation, protein modification and cytotoxicity. This study attempts to examine the protective effect of simvastatin against venlafaxine induced cytotoxicity and oxidative stress in human gingival fibroblasts (HGF) cells.

Materials and methods: In this experimental study, the intracellular ROS generation and IC₅₀ were measured in cells treated with venlafaxine and simvastatin at different concentrations (50, 100, 150, and 200 µM) in pre-treatment in vitro condition.

Results: According to findings, HGF cell viability was significantly different in 150, and 200 µM of simvastatin compared with venlafaxine (P<0.01). Also, simvastatin significantly decreased the effects of venlafaxine by reducing the level of ROS at 150 and 200 µM (P<0.01).

Conclusion: This study suggests that simvastatin attenuates venlafaxine-induced cytotoxicity in HGF cells through scavenging excessive ROS.

Keywords: simvastatin, human gingival fibroblasts cell line, venlafaxine, cell toxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (205): 81-88 (Persian).

* Corresponding Author: Shaghayegh Aghajanshakeri- Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: mslamuk@yahoo.com)

اثرات محافظتی سیمواستاتین بر سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو سلول های فیبروبلاست لته انسانی در مواجهه با داروی ونلافاکسین

سینا کوهستانی¹
محمد شکرزاده²
شقایق آقاچان شاکری³
شقایق شکرزاده⁴

چکیده

سابقه و هدف: ونلافاکسین (Venlafaxine) یک داروی ضد افسردگی از خانواده مهارکننده های بازجذب سروتونین و نوراپی نفرین (SNRIs) می باشد. مطالعات اخیر مکانیسم های متعددی پیرامون سمیت سلولی ناشی از ونلافاکسین را یافته اند، که از جمله آن می توان به کاهش دفاع آنتی اکسیداتیو بدن با کاهش میزان گلو تاتیون داخل سلولی و افزایش میزان ذرات فعال اکسیژن (ROS) و در نهایت ایجاد استرس اکسیداتیو اشاره کرد. این مطالعه قصد دارد تا اثرات محافظتی داروی سیمواستاتین (Simvastatin) را در برابر سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از ونلافاکسین در رده سلولی فیبروبلاست لته مورد سنجش قرار دهد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی کشت سلولی، فاکتور سمیت سلولی (IC₅₀)، استرس اکسیداتیو (میزان ROS) ناشی از ونلافاکسین به عنوان مدل سایتوتوکسیک بررسی شد. پس از به دست آوردن غلظت اپتیمم سمی ونلافاکسین در غلظت 400 μM، اثرات محافظتی سیمواستاتین در غلظت های (50، 100، 150 و 200 μM) در همه تست ها به صورت pre-treatment به همراه ونلافاکسین بررسی شد.

یافته ها: سیمواستاتین در غلظت های 100 و 150 و 200 میکرومولار تفاوت معناداری با ونلافاکسین در زنده مانی سلول های فیبروبلاست لته داشت (P<0/05) و (P<0/01). هم چنین سیمواستاتین با کاهش سطح ذرات فعال اکسیژن در دو غلظت 150 و 200 میکرومولار اثرات ونلافاکسین را به طور معنی داری کاهش داد (P<0/01).

استنتاج: با توجه به نتایج مطالعه حاضر، سیمواستاتین از رده سلولی فیبروبلاست لته در برابر استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی ناشی از ونلافاکسین در غلظت های طراحی شده محافظت می کند.

واژه های کلیدی: سیمواستاتین، سلول فیبروبلاست لته، ونلافاکسین، سمیت سلولی

مقدمه

ونلافاکسین (Venlafaxine) یک داروی ضد افسردگی و سواس جبری، بعضی از اختلالات خوردن و حملات پرمصرف در دنیا می باشد که در درمان افسردگی، اختلال

مؤلف مسئول: محمد شکرزاده - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

1. دانشجوی داروسازی واحد بین الملل رامسر، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

2. استاد، گروه فارماکولوژی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دکترای سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دانشجوی پزشکی واحد بین الملل رامسر، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

تاریخ دریافت: 1400/4/14 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/6/8 تاریخ تصویب: 1400/10/28

E-mail: mslamuk@yahoo.com

دندان دارند که شامل اثرات مثبت آن‌ها بر متابولیسم استخوان، خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی و اثرات احتمالی آن‌ها بر روی اپی‌تلیزاسیون و بهبود زخم‌ها می‌شود (13). سیمواستاتین یک ترکیب آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را از مسیرهای مختلفی اعمال می‌کند. در یکی از این مسیرها سیمواستاتین از طریق مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی مانند هم‌اکسیژناز 1 و گلوکوتایون پراکسیداز و در نتیجه افزایش سطح گلوکوتایون عمل می‌کند (14). در این مطالعه سمیت سلولی ناشی از ونلافاکسین در رده سلولی نرمال فیبروبلاست لته (HGF) به عنوان یک مدل سلولی استاندارد (با توجه به نرمال بودن این رده جهت بررسی دقیق‌تر اثرات سمیت ونلافاکسین، رشد و شرایط مناسب تکثیر) در نظر گرفته شده است. لذا اثرات سیمواستاتین بر روی زنده ماندن سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از ونلافاکسین بر روی سلول‌های فیبروبلاست لته مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، رده سلولی فیبروبلاست لته (HGF) از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک خریداری و در محیط کشت DMEM با افزودن 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS) و 1 درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتوماسین در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان 5 درصد کربن دی‌اکسید کشت داده شدند. طی زمان انکوباسیون، سلول‌ها هر دو روز یک بار در زیر میکروسکوپ جهت بررسی چگونگی رشد سلول‌ها و عدم آلودگی آن‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رسیدن سلول‌ها به میزان 70 درصد رشد در فلاسک سلولی، توسط تریپسین - اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا شده و در دور 1500 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده بودن

می‌شود (2,1). دارو از خانواده داروهای مهارکننده انتخابی بازجذب نوراپی‌نفرین - سروتونین (SNRIs) است و باعث افزایش سروتونین و اپی‌نفرین در مغز می‌گردد (3). مکانیسم‌های متعددی در سمیت ونلافاکسین دخیل می‌باشند که از آن جمله می‌توان به افزایش تولید ذرات فعال اکسیژن (ROS)، کاهش توان آنتی‌اکسیدانی با کاهش سطح گلوکوتایون (GSH) و L-buthionine sulfoximine BSO که مرتبط با افزایش میزان پروتئین کربونیل، مالون دی‌آلدئید، افزایش فعالیت گلوکوتایون S ترانسفراز (GST)، افزایش سطح نیتریک اکساید (NO) و افزایش آنیون‌های سوپراکساید و ... است اشاره کرد (4-6). البته برخی مطالعات اصلی‌ترین علت تولید ذرات فعال اکسیژن توسط ونلافاکسین را ناشی از واکنش آنیون‌های سوپراکساید با نیتریک اکساید و تولید پروکسی نیتريت می‌دانند. در واقع یکی از مسیرهای سایتوکسیستی ونلافاکسین را می‌توان در مسیر متابولیسمی آن جستجو کرد به طوری که اصلی‌ترین منابع افزایش آنیون‌های سوپراکساید آنزیم سیتوکروم P-450 و NADPH oxidase می‌باشند. همچنین افزایش NO باعث افزایش COX2 و در نهایت NF-KB می‌گردد (8,7). فاکتور دیگر دخیل در سمیت ونلافاکسین القای آپوپتوز می‌باشد که این اثر از طریق افزایش ROS، افزایش تجمع یون کلسیم Ca^{2+} داخل سلولی، کاهش پروتئین‌های آنتی‌آپوپتیک ERK1/2 و افزایش پروتئین‌های پروآپوپتیک JNK و p38 MAPK می‌باشد (10,9). ذرات فعال اکسیژن در سطح بالا در ماکرومولکول‌ها تغییرات اکسیداتیو ایجاد کرده و باعث مهار عملکرد پروتئین و پیشبرد مرگ سلولی می‌شوند و با رشد تکثیر بی‌رویه سلولی، در شروع و پیشرفت انواع سرطان نقش بسزایی ایفا می‌کنند (11). سیمواستاتین یک مهارکننده HMG-CoA ردوکتاز است که در معالجه بیماران مبتلا به هایپرکلسترولمی و بیماری‌های قلبی عروقی مورد استفاده قرار می‌گیرد (12). استاتین‌ها تأثیرات مفیدی بر جنبه‌های مختلف سلامت دهان و

نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. اندازه گیری میزان ROS با فلوریمتری و با استفاده از معرف DCFH-DA انجام شد. $20 \mu\text{M}$ DCFH-DA به $2000 \mu\text{l}$ از نمونه اضافه و در 4 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه نگهداری شد. سپس جذب در طول موج تحریکی 312 nm و نشری 420 nm اندازه گیری شد (17). کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Prism Ver.3 و به روش رگرسیون غیر خطی (Nonlinear Regression) انجام شد و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و Post test (Tukey-Kramer multiple comprehension test) مربوطه صورت گرفت و نمودارها توسط همین برنامه گرافیکی رسم شد (18).

یافته ها و بحث

همان‌طور که در جدول شماره 1 مشاهده می‌شود، ونلافاکسین باعث کاهش رشد سلول‌های فیروبلاست لته به میزان $70/78$ درصد در غلظت $400 \mu\text{M}$ شده است. مکانیسم‌های متعددی در سمیت ونلافاکسین دخیل می‌باشند که از آن جمله می‌توان به افزایش تولید ذرات فعال اکسیژن، کاهش توان آنتی‌اکسیدانی با کاهش سطح GSH و L-buthionine sulfoximine BSO مرتبط با افزایش میزان پروتئین کربونیل، مالون دی آلدئید، افزایش فعالیت GST، افزایش سطح NO، افزایش آنیون‌های سوپراکساید و ... اشاره کرد (6,4).

در مطالعات مختلفی مشخص شده است که مصرف طولانی مدت داروهای ضد افسردگی، منجر به بروز آسیب به DNA و سلول می‌شود، به طوری که در مطالعه Brambilla و همکارانش که به بررسی سمیت‌های ژنتیکی و سلولی 104 داروی ضد افسردگی و آنتی‌سایکوتیک پرداختند، مشخص شد که 57 مورد از داروهای مورد

سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین گردید. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای 90 درصد برای انجام تست استفاده شد (15). در متد MTT ابتدا به هر چاهک از پلیت 96 خانه، $90 \mu\text{l}$ میکرولیتر محیط کشت مناسب که حاوی 10^5 عدد سلول از رده سلولی فیروبلاست لته است، اضافه شد. بعد از گذشت 24 ساعت انکوباسیون سلول‌ها در پلیت 96 خانه، غلظت‌های مورد نظر از سیمواستاتین و داروی ونلافاکسین به سلول‌های کاشته شده به صورت Pre-treatment تزریق شد. گروه‌بندی‌ها برای هر دو تست MTT و ROS به صورت: گروه کنترل منفی، گروه درمانی با ونلافاکسین، گروه‌های درمانی ونلافاکسین (در غلظت IC_{50} برابر $400 \mu\text{M}$) به همراه سیمواستاتین در غلظت‌های (50، 100، 150، $200 \mu\text{M}$) طراحی شد. سلول‌ها برای مدت 48 ساعت دیگر به هدف تماس کافی با مواد مورد آزمایش در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از گذشت زمان مورد نظر، پلیت‌های 96 خانه‌ای را از انکوباتور خارج کردیم و سلول‌ها را 3 مرتبه و هر بار با $0/5$ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل شست و شو دادیم (16). به هر چاهک 50 میکرولیتر محلول MTT اضافه کرده و پلیت‌های 96 خانه‌ای را به مدت 4 ساعت در انکوباتور قرار دادیم. پس از طی شدن زمان لازم، محلول MTT درون چاهک‌ها را خارج کرده و $50 \mu\text{l}$ میکرولیتر محلول DMSO رقیق شده با محیط کشت در $5 \mu\text{l}$ میلی‌لیتر محلول محیط کشت به هر چاهک افزوده و 15 دقیقه صبر کردیم. پس از 15 دقیقه، جذب کلنی‌های سلولی رنگ گرفته در هر چاهک با دستگاه ELISA Reader در 2 طول موج 570 و 630

جدول شماره 1: میانگین و انحراف معیار داده‌ها در مواجهه سیمواستاتین به همراه ونلافاکسین بر زنده مانی سلول‌های فیروبلاست لته

Sim200+Ven	Sim150+Ven	Sim100+Ven	Sim 50+Ven	Ven	control -	
88/44	78/51	74/82	71/61	70/78	100/0	Mean
1/647	1/932	1/752	3/200	1/338	0/000	Std. Deviation
0/9509	1/115	1/011	1/848	0/7726	0/000	Std. Error of Mean

آزمایش، حداقل دارای یکی از عوارض ژنتیکی یا سلولی بوده‌اند (19).

همچنین در مطالعه Hervik نیز مشخص شد که استفاده طولانی مدت از ونلافاکسین منجر به بروز سمیت سلولی و افزایش ریسک سرطان پستان می‌شود که نتایج این مطالعه نیز با مطالعه حاضر همخوانی دارد (20). با توجه به آسیب‌های ایجاد شده توسط ونلافاکسین در مطالعات *In vivo* و *In vitro* استراژی‌های محافظتی علیه آسیب ناشی از این داروی ضد افسردگی ضروری به نظر می‌رسد. سیمواستاتین از داروهای کاهنده چربی خون است که اگرچه تاثیر اصلی آن در کاهش کلسترول خون است ولی به میزان کم‌تری تری‌گلیسیرید خون را نیز کاهش می‌دهد. کاهش تری‌گلیسیرید به نوبه خود باعث کاهش بیماری قلبی می‌شود. این دارو با مهار آنزیم HMG-CoA Reductase باعث کاهش سرعت سنتز کلسترول LDL در کبد می‌شود و در نهایت میزان کلسترول خون را کاهش می‌دهد (21). مطالعات نشان داده است که استاتین‌ها دارای اثرات محافظتی در برخی از بافت‌ها می‌باشند. برای مثال سیمواستاتین سمیت کلیوی و کبدی ناشی از سیس پلاتین را در موش‌های صحرایی کاهش داده است (22). سیمواستاتین یک ترکیب آنتی‌اکسیدان قوی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را از مسیرهای مختلفی اعمال می‌کند. در یکی از این مسیرها سیمواستاتین از طریق مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی مانند هم‌اکسیژناز 1 و گلوکاتایون پراکسیداز و در نتیجه افزایش سطح گلوکاتایون عمل می‌کند (23، 24). در مطالعه حاضر مواجهه سلول‌های فیبروبلاست لته با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین به همراه ونلافاکسین باعث اثر مثبت بر حیات سلولی شده است، به طوری که با افزایش غلظت، شاهد کاهش اثرات سمی ونلافاکسین و افزایش رشد سلولی بودیم و این میزان رشد از 71/60 درصد در غلظت 50 به میزان 88/44 درصد در غلظت 200 رسید. با در نظرگیری نمودار شماره 1، از لحاظ مقایسه آماری در این بین غلظت‌های 100 و 150 و 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر سیمواستاتین

تفاوت معناداری با ونلافاکسین داشته است ($P < 0/05$) و مقادیر تولیدی ذرات فعال اکسیژن پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین به همراه ونلافاکسین به‌عنوان مکانیسم ایجاد استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری شدند. همان‌طور که در نمودار شماره 2 مشاهده می‌شود، میزان ROS در تمامی غلظت‌های 50 و 100 و 150 و 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر سیمواستاتین به ترتیب با سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) و ($P < 0/01$) در سلول‌های فیبروبلاست لته کاهش یافت. بر طبق جدول شماره 2 مشخص است ونلافاکسین از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو به میزان 43/59 درصد سبب کاهش رشد سلول‌های نرمال شده است. در مطالعه انجام شده توسط Singh و همکاران نشان داده شد که ونلافاکسین در سلول‌های مغزی رت‌های نوزاد باعث القای آپوپتوز شده است که این اثر از طریق افزایش ROS، افزایش تجمع Ca^{2+} داخل سلولی، کاهش MMP، کاهش پروتئین‌های آن‌تی‌آپوپتوتیک ERK1/2 و افزایش پروتئین‌های پروآپوپتوتیک JNK و p38 MAPK می‌باشد که این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر بوده است (25). همچنین یافته‌ها در راستای مطالعه احمدیان و همکاران بر روی سلول‌های هپاتوسیت رت بوده است. نتایج آزمایشات آن‌ها نیز حاکی از افزایش چشمگیر میزان ROS و پراکسیداسیون لیپیدی و نیز از دست رفتن محتوای GSH سلولی پس از تجویز دوز 2 میلی‌مولار ونلافاکسین بود (7). در این بین مواجهه با سیمواستاتین در غلظت‌های مختلف باعث کاهش سمیت ونلافاکسین و بهبود رشد سلول‌های فیبروبلاست شده است. به طوری که میزان استرس اکسیداتیو از 38/55 درصد در غلظت 50 به 30/30 درصد در غلظت 200 رسیده است. Zhao و همکارانش در سال 2012 مطالعه‌ای پیرامون اثرات محافظتی سیمواستاتین بر آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 در سلول‌های استئوسارکومای انسانی را مورد بررسی قرار دادند. سیمواستاتین از طریق کاهش تنظیم فعال‌سازی کاسپاز-3 و کاسپاز-9 و تنظیم

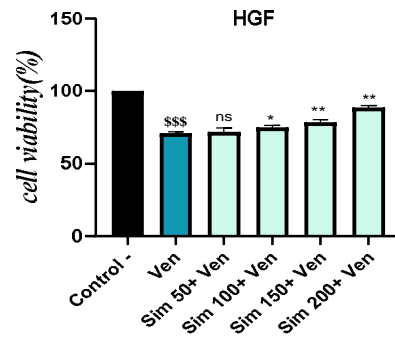
میکروگرم بر میلی لیتر بر استرس اکسیداتیو (فاکتور ROS) ناشی از ونلافاکسین در رده سلول های فیبروبلاست لته
 $P > 0/05$ **: معنی داری در غلظت های 50 و 100 میکروگرم بر میلی لیتر سیمواستاتین نسبت به گروه درمانی با ونلافاکسین
 $P > 0/01$ **: معنی داری در غلظت های 150 و 200 میکروگرم بر میلی لیتر سیمواستاتین نسبت به گروه درمانی با ونلافاکسین
 $P > 0/001$ ### : معنی داری نسبت به گروه کنترل منفی

Nishiya همکاران در سال 2019 نشان دادند سیمواستاتین از طریق تنظیم بیان NF-kB/p65 مانع از مرگ سلولی کبد و طحال می شود، سیمواستاتین اثرات آنتی آپوپتیک، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی از خود نشان داده است که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی داشته است (27). در مطالعه ای دیگر سیمواستاتین بیان اسید فسفاتاز مقاوم در برابر تارتارات (TRAP) به عنوان نشانگر ژنتیکی تمایز استئوکلاست را کاهش داد و تولید ROS درون سلولی را در رده های سلولی RAW 264.7 مهار کرد (28). این نتایج با اثرات مهار سیمواستاتین در کنترل ROS ایجاد شده توسط ونلافاکسین در رده نرمال در مطالعه ما همخوانی داشته است. استاتین ها اخیراً به عنوان یک استراتژی درمانی جدید برای چندین شرایط، توجه مستقیمی را به خود جلب کرده اند، که به طور غیر مستقیم با عادی سازی پروفایل لیپیدها و جلوگیری از بیماری های قلبی - عروقی (CVD) ارتباط ندارند (29). در مطالعه حاضر نیز اثرات سیمواستاتین به عنوان ترکیبی سایتوپروتکتیو در غلظت های مختلف بر سمیت سلولی ناشی از ونلافاکسین بر روی رده سلولی فیبروبلاست لته با اختلاف معنی داری همراه بوده است.

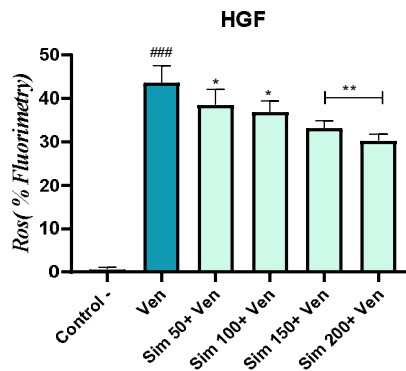
References

1. D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, Serra G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *European Journal of Pharmacology* 2000; 405(1-3): 365-373.
2. Paulzen M, Haen E, Hiemke C, Fay B, Unholzer S, Gründer G, et al. Antidepressant

بیان Bcl-2، از سلول های MG63 در برابر آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کرده است (26). سیمواستاتین در چندین مطالعه از اثرات سمی داروهای مختلفی از طریق مسیر آنتی آپوپتیک و آنتی اکسیدانی جلوگیری کرده است (24).



نمودار شماره 1: اثر سیمواستاتین در غلظت 50-100-150 و 200 میکروگرم بر میلی لیتر به همراه ونلافاکسین بر زنده ماندن سلول های فیبروبلاست لته
 $P > 0/05$ **: معنی داری در غلظت های 150 و 200 میکروگرم بر میلی لیتر سیمواستاتین نسبت به گروه درمانی با ونلافاکسین
 $P > 0/001$ ### : معنی داری نسبت به گروه کنترل منفی



نمودار شماره 2: اثر سیمواستاتین در غلظت 50-100-150 و 200

- polypharmacy and the potential of pharmacokinetic interactions: doxepin but not mirtazapine causes clinically relevant changes in venlafaxine metabolism. *Journal of Affective Disorders* 2018; 227: 506-511.
3. Halldórsdóttir ÁP, Proppé GB, Hauksdóttir

- H. Formulation of extended release tablets, the generic drug Venlafaxin Hagi 2020.
4. Herbet M, Gawrońska-Grzywacz M, Jagiełło-Wójtowicz E. Evaluation of selected biochemical parameters of oxidative stress in rats pretreated with rosuvastatin and fluoxetine. *Acta Pol Pharm* 2015; 72(2): 261-265.
 5. Slamon DN, Ward TH, Butler J, Pentreath VW. Assessment of DNA damage in C6 glioma cells after antidepressant treatment using an alkaline comet assay. *Arch Toxicol* 2001; 75(4): 243-250.
 6. Zlatković J, Todorović N, Tomanović N, Bošković M, Djordjević S, Lazarević-Pašti T, et al. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: a histopathological study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 59: 20-30.
 7. Ahmadian E, Babaei H, Nayebi AM, Eftekhari A, Eghbal MA. Venlafaxine-induced cytotoxicity towards isolated rat hepatocytes involves oxidative stress and mitochondrial/lysosomal dysfunction. *Advanced pharmaceutical Bulletin* 2016; 6(4): 521-530.
 8. Balmus IM, Ciobica A, Antioch I, Dobrin R, Timofte D. Oxidative stress implications in the affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 3975101.
 9. Lee CS, Kim YJ, Jang ER, Kim W, Myung SC. Fluoxetine Induces Apoptosis in Ovarian Carcinoma Cell Line OVCAR-3 Through Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of Nuclear Factor- κ B. *Basic Clin Pharmacol & Toxicol* 2010; 106(6): 446-453.
 10. Silva MCC, de Sousa CNS, Gomes PXL, de Oliveira GV, Araújo FYR, Ximenes NC, et al. Evidence for protective effect of lipoic acid and desvenlafaxine on oxidative stress in a model depression in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2016; 64: 142-148.
 11. Kwon DH, Cha HJ, Lee H, Hong SH, Park C, Park SH, et al. Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-2/heme oxygenase-1 pathway. *Antioxidants* 2019; 8(4): 82.
 12. Mirza ZB, Hu S, Amorosa LF. Bone scintigraphy of severe hypercalcemia following simvastatin induced rhabdomyolysis. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2016; 13(3): 257-261.
 13. Fawzy M, Alhadainy HA, Salah-Uddin M, Abdulrab S. Management of cracked tooth using simvastatin as intracanal medicament. *Clin Case Rep* 2020; 8(12): 3049-3052.
 14. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS, et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *New England Journal of Medicine* 2001; 345(22): 1583-1592.
 15. Ghassemi-Barghi N, Varshosaz J, Etebari M, Jafarian Dehkordi A. Role of recombinant human erythropoietin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles in busulfan-induced genotoxicity: Analysis of DNA fragmentation via comet assay in cultured HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 2016; 36: 46-52.
 16. Karamian A, Shokrzadeh M, Ahmadi A. The potential chemoprotective effects of melatonin against genotoxicity induced by diazinon in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol*

- Ind Health 2016; 32(2): 360-366.
17. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Advanced protocols in oxidative stress II*, Berlin: Springer; 2010: 57-72.
 18. Shadboorestan A, Shokrzadeh M, Ahangar N, Abdollahi M, Omidi M, Payam SSH. The chemoprotective effects of L-carnitine against genotoxicity induced by diazinon in rat blood lymphocyte. *Toxicology and Industrial Health* 2015; 31(12): 1334-1340.
 19. Brambilla G, Mattioli F, Martelli A. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. *Toxicology* 2009; 261(3): 77-88.
 20. Hervik JB, Stub T. Adverse effects of non-hormonal pharmacological interventions in breast cancer survivors, suffering from hot flashes: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 160(2): 223-236.
 21. Todd PA, Goa KL. Simvastatin: A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hyperlipidaemia. *Drugs* 1990; 40(4): 583-607.
 22. Scaria A, Kamath JV, Chakraborty M. Anti Hyperglycemic, Anti Oxidant, Anti Hyperlipidemic & Nephroprotective Effect of Stevioside in Diabetic Rats. *International Journal of Ayurvedic Medicine* 2017; 8(4).
 23. Fisar Z, Hroudová J, Singh N, Koprivova A, Maceckova D. Effect of Simvastatin, Coenzyme Q¹⁰, Resveratrol, Acetylcysteine and Acetylcarnitine on Mitochondrial Respiration. *Folia Biologica* 2016; 62(2): 53-66.
 24. Reith C, Staplin N, Herrington W, Stevens W, Emberson J, Haynes R, et al. Effect on non-vascular outcomes of lowering LDL cholesterol in patients with chronic kidney disease: results from the Study of Heart and Renal Protection. *BMC Nephrology* 2017; 18(1): 147.
 25. Singh M, Singh K, Shukla S, Dikshit M. Assessment of in-utero venlafaxine induced, ROS-mediated, apoptotic neurodegeneration in fetal neocortex and neurobehavioral sequelae in rat offspring. *Int J Dev Neurosci* 2015; 40: 60-69.
 26. Zhao XH, Xu ZR, Zhang Q, Yang YM. Simvastatin protects human osteosarcoma cells from oxidative stress-induced apoptosis through mitochondrial-mediated signaling. *Mol Med Rep* 2012; 5(2): 483-488.
 27. Nishiya M, Yasuhira S, Shibazaki M, Oikawa H, Masuda T, Maesawa C. Fluvastatin exerts an antitumor effect in vemurafenib-resistant melanoma cells. *Anticancer Drugs* 2019; 30(5): 451-457.
 28. Moon HJ, Kim SE, Yun YP, Hwang YS, Bang JB, Park JH, et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. *Experimental & Molecular Medicine* 2011; 43(11): 605-612.
 29. Parizadeh SM, Azarpazhooh MR, Moohebati M, Nematy M, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, et al. Simvastatin therapy reduces prooxidant-antioxidant balance: results of a placebo-controlled cross-over trial. *Lipids* 2011; 46(4): 333-340.