

C6 Glioma Hücre Hattında Glutamat Toksisitesine Karşı Sodyum Hidrojen Sülfidin (NaHS) Koruyucu Rolü

The Protective Role of Sodium Hydrogen Sulfide (NaHS) Against Glutamate Toxicity in the C6 Glioma Cell Line

 Aybüken BIÇAK¹

 Ayşegül ÖZTÜRK²

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem 5, Sivas, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sivas, Türkiye

Corresponding author:

Ayşegül ÖZTÜRK, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sivas, Türkiye

E-mail:

aysegulozturk@cumhuriyet.edu.tr

Received/Accepted: Dec 2024

Conflict of interest: There is not a conflict of interest.

How to Cite

Biçak, A., Öztürk A. (2024). C6 Glioma Hücre Hattında Glutamat Toksisitesine Karşı Sodyum Hidrojen Sülfidin (NaHS) Koruyucu Rolü. *Health Sciences Student Journal*, 4(2), 54-58.

ÖZET

Amaç: Glutamat, merkezi sinir sisteminin temel uyarıcı nörotransmitteri olup, normal sinirsel fizyolojik süreçlerde hayati bir rol oynar. Ancak, glutamatın aşırı birikimi eksitotoksisite adı verilen bir süreç aracılığıyla nöronal hasara yol açabilir. Literatürde, hidrojen sülfürün (H₂S) çeşitli nöroprotektif etkiler sergilediği bildirilmiş olmasına rağmen, glutamat kaynaklı toksisite üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, C6 glial hücre hattında sodyum hidrojen sülfürün (NaHS), glutamat eksitotoksisitesine karşı olası koruyucu etkilerini araştırmaktır.

Yöntem: C6 glioma hücreleri kültüre edildikten sonra, dört farklı grup oluşturulmuştur: (1) Kontrol grubu, (2) Glutamat grubu, (3) Sodyum Hidrojen Sülfür grubu ve (4) Sodyum Hidrojen Sülfür + Glutamat grubu. Tüm gruplarda, uygulanan tedavilerin C6 hücre hattında hücre canlılığı (XTT yöntemi) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Bulgular: NaHS uygulamasının, glutamatın hücre canlılığını azaltıcı etkisini önleyemediği görülmüştür (p>0.05).

Sonuç: Bu bulgular, NaHS'in glutamatın neden olduğu hücre hasara karşı nöroprotektif bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Glutamat, Eksitotoksite, Sodyum Hidrojen Sülfid, C6 Glioma.

ABSTRACT

Objective: Glutamate, the primary excitatory neurotransmitter in the central nervous system, plays a vital role in normal neural processes. However, excessive accumulation of glutamate can lead to neuronal damage through excitotoxicity. Although hydrogen sulfide (H₂S) has been reported to have various neuroprotective effects, its role in glutamate-induced toxicity remains unclear. This study aimed to investigate the potential protective effects of sodium hydrogen sulfide (NaHS) against glutamate excitotoxicity in a C6 glioma cell line.

Methods: C6 glioma cells were cultured and divided into four groups: (1) Control, (2) Glutamate, (3) Sodium Hydrogen Sulfide, and (4) Sodium Hydrogen Sulfide + Glutamate. The effects of treatments on cell viability were assessed using the XTT assay.

Results: NaHS did not prevent the glutamate-induced reduction in cell viability (p>0.05).

Conclusion: These findings suggest that NaHS does not exert neuroprotective effects against glutamate-induced cellular damage.

Keywords: Glutamate, Excitotoxicity, Sodium Hydrogen Sulfide, C6 Glioma.

GİRİŞ

Glutamat, sinir sisteminde uyarıcı özellik gösteren bir amino asit nörotransmitteridir. Nörotransmitterler, nöronlar arasında iletişimi sağlayan moleküllerdir ve bu iletişim uyarıcı veya baskılayıcı etkiler oluşturabilir. Glutamat ve aspartat başlıca uyarıcı amino asit nörotransmitterler olarak işlev görürken, GABA, glisin ve taurin gibi moleküller inhibe edici etkiler göstermektedir¹. Glutamat, özellikle kortikal piramidal hücrelerde, serebellumda, striatumda ve hareket kontrolünde kritik rol oynayan kortikostriatal alanlarda yüksek yoğunluklarda bulunmaktadır. Uyarıcı amino asit sistemleri, nöronal gelişim süreçlerini teşvik etme veya baskılama potansiyeline sahiptir ve bu nedenle sinir sistemi işlevlerinde, nöroplastisite süreçlerinde, sinaptik etkinliğin modülasyonunda ve sinaptik yapının yeniden şekillenmesinde önemli bir rol oynamaktadır^{2,3}.

Patolojik durumlar veya beyin hasarı gibi durumlarda, glutamatın hücre dışı birikimi artabilir. Bu artış, NMDA reseptör kanalları aracılığıyla kalsiyum iyonlarının hücre içine aşırı girişine yol açar. Hücre içine aşırı miktarda giren kalsiyum, mitokondriyal disfonksiyona neden olarak sinir hasarını ve hücre ölümünü tetikler. Bu süreç, *glutamat eksitotoksitesi* olarak adlandırılmaktadır. Glutamat ve kalsiyum konsantrasyonlarındaki bu artış, proapoptotik genlerin transkripsiyon faktörlerini aktive ederken, antiapoptotik genlerin transkripsiyonunu baskılayarak hücre ölüm süreçlerini hızlandırır^{4,5}.

Aşırı glutamat salınımı sonucunda hücreler apoptoza sürüklenir⁶. Glutamat eksitotoksitesi, aşağıdaki hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır:

- Amiyotrofik lateral skleroz
- Multipl skleroz
- Alzheimer hastalığı
- Parkinson hastalığı
- Huntington hastalığı
- Epilepsi⁷⁻¹⁰.

Glutamat salınımının kontrol altına alınması, birçok nörodejeneratif hastalığın standart tedavisine yönelik yeni bir yaklaşım sunabilir. Merkezi sinir sisteminde astrositler, nörogenez, sinaps gelişimi ve kan akışının düzenlenmesi gibi kritik işlevleri yerine getirmektedir. Ayrıca, astrositler, çevrelerindeki çeşitli hücrelerle etkileşim kurar ve uyarılmış nöronlardan salınan glutamatın bağlandığı glutamat reseptörlerini eksprese eder. Bu özellik, astrositlerin nöronal aktivitelere yanıt verebilmesini sağlar¹¹⁻¹⁴. Ancak, aşırı glutamat salınımı astroglial hücrelerin işlevlerini bozarak bu hücrelerin fizyolojik rollerini olumsuz etkiler¹⁵. Bu nedenle astrositler, glutamat kaynaklı eksitotoksiteye yönelik tedaviler için potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmektedir.

Hidrojen sülfür (H₂S), beyinde bir sinaptik modülatör ve nöroprotektan olarak işlev görmektedir¹⁶. H₂S, astrositlerde hücre içi kalsiyum (Ca²⁺) konsantrasyonlarını düzenleyerek önemli bir sinyal molekülü olarak rol oynar¹⁷. H₂S'in biyolojik etkilerini incelemek amacıyla sodyum hidrosülfid (NaHS) ve sodyum sülfür (Na₂S) gibi sülfür tuzları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu donörler, kısa sürede büyük miktarda H₂S üreterek hücre ölümüne ve hayvan deney sistemlerinde yaygın şekilde uygulanmaktadır.

Bu bağlamda, çalışmamızda C6 glial hücrelerinde glutamat kaynaklı

eksitotoksositeye karşı NaHS'in koruyucu etkileri araştırılmıştır. Literatürde, H₂S'in nöroprotektan etkileri üzerine yapılan çalışmalar, bu molekülün mitokondriyal fonksiyonları koruyarak miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarına karşı kalp kasını koruduğunu ortaya koymaktadır^{18,19}. Kimura ve arkadaşlarının çalışmaları ise H₂S'in nöronları oksidatif strese karşı koruduğunu, hücre içi önemli bir antioksidan olan glutatyon seviyelerini artırarak hücre canlılığını geliştirdiğini göstermiştir²⁰. Ancak, H₂S'in glutamat toksisitesine karşı koruyucu etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, glutamat toksisitesi oluşturulmuş C6 glial hücrelerinde NaHS'in koruyucu etkileri deneysel olarak değerlendirilmiştir.

YÖNTEM VE BULGULAR

Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan malzemeler şunlardır: C6 glioma hücre hattı (CRL107TM), penisilin/streptomisin (10,000 U/mL), DMEM/Besleyici Karışımı F-12 Ham (1:1), fetal sığır serumu (FBS), tripsin-EDTA çözeltisi ve NaHS asit. Hücre kültürü işlemleri için gerekli olan tüm sarf malzemeleri steril koşullarda kullanılmıştır.

Hücre Kültürü

C6 glioma hücreleri, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilmiştir. Hücreler, steril koşullar altında, 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu eklenmiş DMEM:F12 (1:1) besi yerinde, 25 cm²'lik kültür flasklarında kültüre edilmiştir. Hücreler, %80 yoğunluğa ulaştıklarında tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak pasajlanmış ve üçüncü pasaj sonrası deneysel çalışmalara başlanmıştır.

Deneysel Model

C6 glioma hücre hattı, NMDA aracılı glutamat toksisitesi modellerinde kullanılmaya uygunluğu literatürde belirlenmiş bir modeldir²¹. Glutamat toksisitesini indüklemek amacıyla, önceki çalışmalarda etkinliği gösterilen 10 mM glutamat dozu ve 24 saatlik inkübasyon süresi bu çalışmada da uygulanmıştır²².

NaHS Dozları

NaHS asit, çalışmada farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir. Belirlenen dozlar sırasıyla 20, 10, 5, 2.5 ve 1.25 µM olarak uygulanmıştır. Bu dozlar, H₂S'in C6 hücrelerinde glutamat toksisitesine karşı etkilerini değerlendirmek için optimize edilmiştir.

XTT Hücre Canlılık Testi

NaHS'in glutamat toksisitesi sonrası C6 glioma hücrelerindeki canlılık üzerine etkisi, XTT testi kullanılarak değerlendirildi. Bu yöntem, metabolik olarak aktif hücrelerin, tetrazolyum tuzu olan XTT'yi suda çözünebilir turuncu formazan bileşenlerine indirgeyebilme kapasitesine dayanmaktadır. Oluşan turuncu renkli boya, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır ve spektrofotometre ile belirli dalga boylarında ölçülebilir.

Deneysel Prosedürü

Her kuyucukta 10 x 10³ hücre olacak şekilde steril 96 kuyucuklu mikro plakaya hücreler eklendi. Hücrelerin yapışması için plaka bir gece inkübatörde bekletildi. Ertesi gün, hücreler üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda NaHS uygulandıktan 1 saat sonra 10 mM glutamat eklendi. Uygulama sonrası hücreler 24 saat boyunca %5 CO₂'li 37 °C'de inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından, hücreler üzerindeki

besi yeri uzaklaştırılarak kuyucuklar üç kez PBS ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL renksiz DMEM ve 50 µL XTT çözeltisi eklendi. Plaka, CO₂'li etüvde 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, oluşan boyanın optik dansitesi 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Hücre canlılık oranı, kontrol grubunun canlılık oranı %100 kabul edilip % hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplandı.

İstatiksel Analiz

Veriler, SPSS 23.0 ile analiz edilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

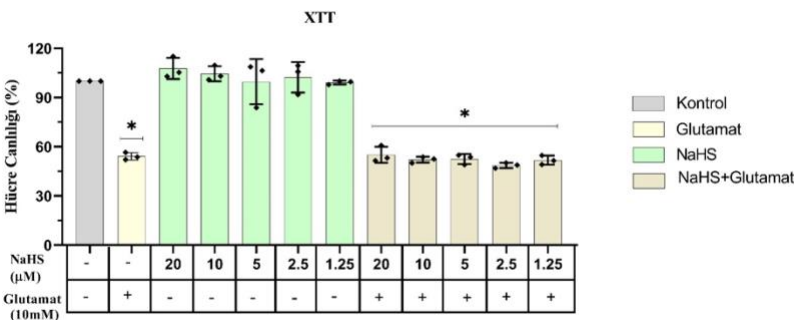
BULGULAR

NaHS'in, C6 glioma hücrelerinde glutamat tarafından indüklenen sitotoksositeye karşı koruyucu etkisi XTT hücre canlılık testi ile incelenmiştir. Farklı dozlarda NaHS uygulanıp glutamat toksisitesine maruz bırakıldıktan sonra yapılan XTT testi sonuçları, NaHS uygulanan gruplarda canlı hücre oranlarının yalnızca glutamat uygulanan grupla kıyasla anlamlı bir artış göstermediğini ortaya koymuştur.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, NaHS'nin glutamat kaynaklı nörotoksositeye karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, NaHS'nin glutamatın neden olduğu hücre ölümünü engellemediğini göstermektedir. Glutamatın aşırı salınımı, hücre ölümüne yol açarken, NaHS tedavisi herhangi bir etki göstermemiştir.

Hidrojen sülfür (H₂S), en bol bulunan üçüncü doğal gazdır ve hücre döngüsü, tümör progresyonu ve çeşitli fizyolojik süreçlerle ilişkilidir²³. Ayrıca H₂S, anjiyogenez, tümör büyümesi, hücrel ve mitokondriyal biyogenez, tümör kan akışı, göç ve invazyon, metastaz, protein sülfhidrasyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş, DNA onarımı ve kemoterapi direnci dahil olmak üzere hücre döngüsü ve tümör progresyonu ile bağlantılı çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar²⁴⁻²⁶. H₂S, normalde vücutta birçok biyolojik fonksiyonu desteklerken, çevresel kirletici olarak toksik etkiler de gösterebilir. Hücre ölümünü tetikleme konusunda H₂S'nin hem pro-apoptoz hem de anti-apoptoz etkiler yaratabileceği gösterilmiştir²⁷. Örneğin, kolon kanseri hücrelerinde H₂S, apoptozu koruyabilirken, bazı hücrelerde proliferasyonu artırabilir^{28, 29}. Lee ve ark., farklı hücre hatlarında küçük ve yüksek doz NaHS uygulayarak anlamlı bir fark bulamadılar³⁰. Hooi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hızlı H₂S donörü olan NaHS ile yapılan kronik tedavi, diyabetle ilişkili oksidatif stresin azalmasına yol açmıştır. Bu etki, muhtemelen NADPH oksidazın NOX2 izoformunun inhibisyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu mekanizma, damar sisteminde nitrik oksit (NO) üretiminin ve etkisinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Bu bulgular, H₂S ve H₂S donörlerinin antioksidan etkilerinin,



Şekil 1. NaHS'in glutamat kaynaklı sitotoksosite sonrası C6 hücrelerinde sağ kalım üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. * $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı göstermektedir.

diyabetin vasküler komplikasyonlarının tedavisinde potansiyel bir terapötik seçenek olabileceğini öne sürmektedir³¹.

Çalışmalar, NaHS'in çeşitli nöronal modellerde nöroprotektif rollerini vurgulamıştır. Örneğin, NaHS'nin Alzheimer hastalığı (AD) modellerinde oksidatif stresi azalttığı ve nöroinflamasyonu önlediği gösterilmiştir. Özellikle, NaHS tedavisinin TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını baskıladığı ve mitokondriyal fonksiyonu koruduğu ve mikroglyal kültürlerde amiloid- β kaynaklı toksisiteyi azalttığı bulunmuştur³². Ayrıca NaHS, iskemik beyin hasarını incelemek için kullanılan bir model olan oksijen-glikoz yoksunluğu (OGD) sırasında birincil hipokampal nöronlarda oksidatif strese karşı nöroprotektif etkiler göstermiştir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin azalması ve süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon gibi antioksidan savunmaların artmasıyla gösterilen oksidatif hasarı hafifletir³³. Bu bulgular, NaHS'nin sadece Alzheimer'da değil, oksidatif stres ve nöroinflamasyonu modüle ederek diğer nörodejeneratif durumlarda da faydalı olabileceğini ve daha fazla keşif için potansiyel bir terapötik yol sunduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda C6 glioma hücre hattına NaHS uygulandığında, glutamat toksisitesine karşı hücre sağkalımı üzerinde anlamlı bir nöroprotektif etki gözlemlenmemiştir; bu, H₂S'nin farklı dozları ve mekanizmalarının, hücre türüne veya uygulama koşullarına bağlı olarak değişken etkiler gösterebileceğini ve NaHS'in etkisinin, modelin özelliklerine göre sınırlı olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇ

Sonuçlarımız, hidrojen sülfür (H₂S) donörü olan NaHS'in glutamat kaynaklı eksitotoksisiteye karşı nöroprotektif bir etkisi olmadığını göstermektedir. H₂S'in çift yönlü etkisi göz önünde bulundurulduğunda, farklı konsantrasyonlar ve mekanizmalarla değişik etkiler ortaya koyabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar, H₂S'in daha az bilinen özelliklerinin keşfedilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini ve nöroproteksiyon gibi alanlardaki potansiyel terapötik kullanımının daha iyi anlaşılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2022 yılı 2. dönem kapsamında 1919B012216085 numaralı başvurusuyla destek almaya hak kazanmıştır.

KAYNAKÇA

1. Mark, L. P., Prost, R. W., Ulmer, J. L., Smith, M. M., Daniels, D. L., Strottmann, J. M., Brown, W. D., & Hacıbey, L. (2001). Pictorial review of glutamate excitotoxicity: Fundamental concepts for neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*, 22(10), 1813–1824.
2. Belsham, B. (2001). Glutamate and its role in psychiatric illness. *Human Psychopharmacology*, 16(2), 139–146.
3. Tamminga, C. A., Southcott, S., Sacco, C., Wagner, A. D., & Ghose, S. (2012). Glutamate dysfunction in hippocampus: Relevance of dentate gyrus and CA3 signaling. *Schizophrenia Bulletin*, 38(5), 927–935. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs062>
4. Westerberg, E., Monaghan, D. T., Kalimo, H., Cotman, C. W., & Wieloch, T. W. (1989). Dynamic changes of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 9(3), 798–805.

5. Manev, H., Favaron, M., Guidotti, A., & Costa, E. (1989). Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: Role in neuronal death. *Molecular Pharmacology*, 36(1).
6. Rameaut, G. A., Chiu, L. Y., & Ziff, E. B. (2004). Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14307–14314.
7. Hynd, M. R., Scott, H. L., & Dodd, P. R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 45(5), 583–595.
8. Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014). Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 115, 157–188.
9. Pitt, D., Werner, P., & Raine, C. S. (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 6(1), 67–70.
10. Vincent, P., & Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*, 158(1), 309–323.
11. Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417, 39–44.
12. Nagler, K., Mauch, D. H., & Pfrieger, F. W. (2001). Glia-derived signals induce synapse formation in neurons of the rat central nervous system. *Journal of Physiology*, 533, 665–679.
13. Itoh, Y., & Suzuki, N. (2012). Control of brain capillary blood flow. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(6), 1167–1176.
14. Bindocci, E., & Savtchouk, I. (2017). Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 74, 356.
15. Chen, C. J., Liao, S. L., & Kuo, J. S. (2000). Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 75, 1557–1565.
16. Abe, K., & Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*, 16, 1066–1071.
17. Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J., & Kimura, H. (2004). Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB Journal*, 18, 557–559.
18. Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C. W., & Lefter, D. J. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 15560–15565.
19. Sivarajah, A., McDonald, M. C., & Thiemermann, C. (2006). The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock*, 26, 154–161.
20. Kimura, Y., Goto, Y., & Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12, 1–13.
21. Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., & Vavilis, T. D. (2015). Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 1–7.
22. Park, E., Gim, J., Kim, D. K., Kim, C.-S., & Chun, H. S. (2019). Protective effects of alpha-lipoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in C6 glioma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(1), 94–102.
23. Hartle, M. D., & Pluth, M. D. (2016). A practical guide to working with H₂S at the interface of chemistry and biology. *Chemical Society Reviews*, 45(22), 6108–6117.
24. Shackelford, R. E., Mohammad, I. Z., Meram, A. T., Kim, D., Alotaibi, F., Patel, S., Ghali, G. E., & Kevil, C. G. (2021). Molecular functions of hydrogen sulfide in cancer. *Pathophysiology*, 28(3), 437–456.
25. Shackelford, R., Ozluk, E., Islam, M. Z., Hopper, B., Meram, A., Ghali, G., & Kevil, C. G. (2021). Hydrogen sulfide and DNA repair. *Redox Biology*, 38, 101829.
26. Khattak, S., Rauf, M. A., Khan, N. H., Zhang, Q. Q., Chen, H. J., Muhammad, P., Ansari, M. A., et al. (2022). Hydrogen sulfide biology and its role in cancer. *Molecules*, 27(6), 1800–1815.
27. Fiedler, N., Kipen, H., Ohman-Strickland, P., Zhang, J., Weisel, C., Laumbach, R., Kelly-McNeil, K., Olejeme, K., & Liroy, P. (2008). Sensory and cognitive effects of acute exposure to hydrogen sulfide. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 78–85.
28. Cai, W.-J., Wang, M.-J., Ju, L.-H., Wang, C., & Zhu, Y.-C. (2010). Hydrogen sulfide

- induces human colon cancer cell proliferation: Role of Akt, ERK and P21. *Cell Biology International*, 34(6), 565–572.
29. Cao, Q., Zhang, L., Yang, G., Xu, C., & Wang, R. (2010). Butyrate-stimulated H₂S production in colon cancer cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(9), 1101–1109.
 30. Lee, Z. W., Zhou, J., Chen, C. S., Zhao, Y., Tan, C. H., Li, L., Moore, P. K., & Deng, L. W. (2011). The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLOS ONE*, 6(6), e5–e11.
 31. Ng, H. H., Yildiz, G. S., Ku, J. M., Miller, A. A., Woodman, O. L., & Hart, J. L. (2017). Chronic NaHS treatment decreases oxidative stress and improves
 32. Paul, B. D., & Pieper, A. A. (2023). Protective Roles of Hydrogen Sulfide in Alzheimer's Disease and Traumatic Brain Injury. *Antioxidants*, 12(5)
 33. Yu Q, Wang B, Zhao T, Zhang X, Tao L, Shi J, Sun X, Ding Q. NaHS Protects against the Impairments Induced by Oxygen-Glucose Deprivation in Different Ages of Primary Hippocampal Neurons. *Front Cell Neurosci*. 2017 Mar 7;11:67.