

# Investigating repeated exposure to sevoflurane during adolescence and their effects on behavioral and pathological impairment in adult male and female Wistar rats

Mahdieh Nasiri<sup>1</sup>, Javad Fahanik-Babaei<sup>1\*</sup>, Maryam Jafarian<sup>2</sup>, Seyed Khalil Pestehei<sup>3,4</sup>

1. Electrophysiology Research Center, Neuroscience Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Brain and Spinal Cord Injury Research Center, Neuroscience Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Imam Khomeini Hospital Complex, Department of Anesthesiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Neuroscience Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\* Corresponding author e-mail: Fahanikbabaei1358@gmail.com

## Abstract

**Background and Objective:** Repeated anesthesia in adolescence is necessary for some therapeutic interventions, such as radiotherapy or burns. Research has indicated that exposure to general anesthetics during the adolescent period can induce cell death, cognitive and behavioral problems, and later neurobehavioral problems in adulthood. The current study was aimed at providing a detailed morphological and functional evaluation of the long-term impacts of repeated exposure to sevoflurane.

**Materials and Methods:** In this study, 28 adolescent rats were randomly divided into male and female control groups and inhaled sevoflurane (at a concentration of 2%) daily for 15 days. After last anesthesia, animals of all groups were cared for 30-35 days, and then the effects of repeated exposure to sevoflurane on cognitive functions and anxiety behavior were tested by the Morris water maze, open field, and elevated plus maze. Effects of sevoflurane on cell death and the increase of dark neurons were compared in CA1 of the hippocampus and brain cortex. Data were evaluated using one-way and two-way ANOVA.

**Results:** Our results indicated that repeated exposures to sevoflurane during adolescence can cause behavioral problems later in adulthood. We found a significant increase in dark neurons and cell death in the sevoflurane group compared to the control group in both male and female animals.

**Conclusion:** These results may provide a new perspective for understanding the mechanism of repeated exposure to sevoflurane-induced toxic effects in adolescence.

**Keywords:** Repeated anesthesia, Sevoflurane, Morris water maze, Open field, Elevated plus maze, Toluidine blue

Received: Nov 20, 2023

Revised: Jan 29, 2024

Accepted: Feb 13, 2024

**How to cite this article:** Nasiri M, Fahanik-Babaei J, Jafarian M, Pestehei SK. Investigating repeated exposure to sevoflurane during adolescence and their effects on behavioral and pathological impairment in adult male and female Wistar rats. *Daneshvar Medicine* 2024; 31(6):60-74. doi: 10.22070/DANESHMED.2024.18494.1428

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

# بررسی بیهوشی‌های مکرر با داروی سئوفلوران در دوران نوجوانی و اثرات آنها بر اختلالات رفتاری و پاتولوژیک در موش‌های صحرایی بالغ‌شده نر و ماده نژاد ویستار

مهديه نصیری<sup>۱</sup>، جواد فحانیک بابائی<sup>۱\*</sup>، مریم جعفریان<sup>۲</sup>، سید خلیل پسته ای<sup>۳</sup> و<sup>۴</sup>

۱. مرکز تحقیقات الکتروفیزیولوژی، پژوهشکده علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات ضایعات مغزی نخاعی، پژوهشکده علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه بیهوشی، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. پژوهشکده علوم اعصاب (بازتوانی عصبی)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول: جواد فحانیک بابائی Email: Fahanikbabaei1358@gmail.com

## چکیده

**مقدمه و هدف:** بیهوشی‌های مکرر در کودکان و نوجوانان در برخی از مداخلات درمانی مانند رادیوتراپی یا سوختگی‌ها ضرورت پیدا می‌کند. تحقیقات نشان داده که بیهوشی عمومی در دوران نوجوانی می‌تواند باعث مرگ سلولی، مشکلات شناختی و بعداً مشکلات عصبی رفتاری در بزرگسالی شود. مطالعه حاضر با هدف ارائه ارزیابی دقیق مورفولوژیکی و عملکردی اثرات طولانی‌مدت مواجهه مکرر با سووفلوران انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** ۲۸ موش صحرایی نوجوان از روز ۲۴ پس از تولد به صورت تصادفی از مادرهای مختلف جدا شده و به چهار گروه نر و ماده کنترل و استنشاقی سئوفلوران (غلظت درصد روزانه به مدت ۱۵ روز) تقسیم شدند. حیوانات بعد از آخرین بیهوشی در روز ۳۸ به مدت ۳۰ تا ۳۵ روز تحت مراقبت و جهت انجام آزمایش‌های رفتاری شامل آزمون‌های ماز آبی موریس، زمینه باز، مربع مرتفع آماده و سپس تغییرات پاتولوژیک با استفاده از رنگ‌آمیزی تولئیدین بلو بررسی و نتایج با استفاده از آمارهای آماری t تست غیرزوجی و واریانس‌های یک‌طرفه و دوطرفه آنالیز شد.

**نتایج:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در حیوانات نر و ماده، قرارگرفتن مکرر در معرض سووفلوران در دوران نوجوانی می‌تواند باعث اختلال در حافظه فضایی و افزایش اضطراب در بزرگسالی شود. همچنین در حیوانات دریافت‌کننده سووفلوران در مقایسه با گروه کنترل نوروهای تیره و مرگ سلولی در نواحی هیپوکامپ و کورتکس در حیوانات نر و ماده می‌تواند افزایش یابد.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج ممکن است دیدگاه جدیدی برای درک مکانیسم تکرار قرارگرفتن در معرض اثرات سمی ناشی از سووفلوران در نوجوانی ارائه دهد.

**واژه‌های کلیدی:** بیهوشی‌های مکرر، سئوفلوران، ماز آبی موریس، ماز زمینه باز، ماز مربع مرتفع، تولئیدین بلو

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۰۸/۲۹

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۸

## مقدمه

بیهوشی های مکرر در کودکان در برخی از مداخلات درمانی مانند انجام لیزر پوست برای ضایعات مادرزادی پوستی، انجام رادیوتراپی برای تومورهای دوران کودکی و یا سوختگی ها ضرورت پیدا می کند و این مسئله باعث نگرانی والدین کودکان در مورد عوارض ناشی از این بیهوشی های پرتعداد شده است. استفاده از داروهای بیهوشی در کودکان ثابت شده که دارای اثرات جانبی متعددی در سیستم عصبی کودکان در حین مرحله کلیدی تکامل مغز دارد (۱) و انتخاب یک روش بیهوشی کم عارضه برای رشد و تکامل سیستم عصبی کودکان یک اولویت ضروری خواهد بود.

مطالعات انجام شده در طی سال های گذشته نشان داده اند که اثرات تکاملی بیهوشی در نوزادان چونندگان ممکن است نه تنها تداخلات فارماکولوژیک را در زمان بیهوشی ایجاد کند، بلکه اثرات آن بعد از بیهوشی می تواند ماندگار شده و تأثیرات متعددی در رفتار و عملکرد نرونی آنها بگذارد. این نتایج می تواند شروعی برای این احتمال باشد که عواقب عملکردی استفاده مکرر از داروهای بیهوشی در نوزادان و کودکان تحت بیهوشی عمومی منجر به اثرات حاد در زمان بیهوشی و فاکتورهای محیطی پس از بیهوشی همچون بیماری، عصبانیت، درد، محرومیت مادرانه و غیره شود. قرار گرفتن در معرض داروهای بیهوشی در دوران نوزادی یا کودکی احتمال عوارض جانبی بلندمدت روی شناخت و رفتار آنها را بالا می برد، به طوری که نوروتوکسیتیسیت عصبی در بسیاری از گونه های حیوانی امروزه ثابت شده است. اگرچه اثرات مستقیم آن در انسان هنوز به درستی تأیید نشده است (۴-۲). یافته های متعددی نشان می دهند که اثرات استفاده مکرر داروهای بیهوشی در کودکان می تواند این اختلالات را تشدید کند.

سئوفلوران یک ماده بیهوشی خوشبو و غیرقابل اشتعال است این ماده متداول ترین داروی بیهوشی استنشاقی در اعمال جراحی سرپایی و بیهوشی عمومی در اطفال و نوزادان در حین جراحی می باشد و همچنین داروی مناسبی در زایمان سزارین و دامپزشکی است (۳، ۵، ۶). مطالعات بالینی نشان داده اند که مواجهه طولانی مدت با سئوفلوران (<math>3</math> ساعت) به طور قابل توجهی خطر اختلال شناختی و

نواقص رفتاری را در درازمدت پس از عمل جراحی در پی دارد (۱، ۷). سئوفلوران فشار داخل جمجمه را افزایش داده و فعالیت عصبی را در مراحل کلیدی تکامل مغز نوزادان و سرعت متابولیک را کاهش می دهد (۸، ۹). مطالعات حیوانی نشان داده اند که قرار گرفتن مکرر در معرض داروهای بیهوشی مانند سئوفلوران، بدون توجه به غلظت، حجم هیپوکامپ، تعداد نورون ها و طول دندریت را در موش های نوزاد کاهش می دهد، این کاهش زمانی بدتر می شود که غلظت بالاتری از سئوفلوران استفاده شود، علاوه بر این قرار گرفتن مکرر در معرض سئوفلوران می تواند منجر به اختلال عملکردی در حیوانات تحت آزمایش شود، به طوری که اختلال در یادگیری و حافظه فضایی ایجاد شده و همچنین موجب رفتارهای اجتماعی غیرطبیعی شود (۱۴-۱۰).

علی رغم مطالعات بسیاری که بر روی اثرات جانبی سئوفلوران در کودکان و نوجوانان وجود دارد اما اطلاعات کمی در مورد اثرات سئوفلوران به صورت مکرر و کوتاه مدت در دوران نوجوانی و تداوم این اثرات در دوران بزرگسالی وجود دارد، از سوی دیگر این مطالعات در انسان با محدودیت هایی همراه است؛ بنابراین، در این مطالعه سعی داریم با بررسی تغییرات رفتاری، حافظه و یادگیری و همچنین تغییرات بافت شناسی موش های صحرائی بالغ، به ارزیابی اثرات طولانی مدت سئوفلوران تجویز شده در دوران پیش نوجوانی بپردازیم. نتایج این پژوهش می تواند به منظور کاهش اثرات جانبی و درازمدت داروهای بیهوشی در افرادی با سنین پایین، اطلاعات مؤثری را در اختیار پزشکان قرار داده و به آنها در انتخاب ماده بیهوشی و مقدار تجویز آنها اطلاعات مفیدی ارائه کند.

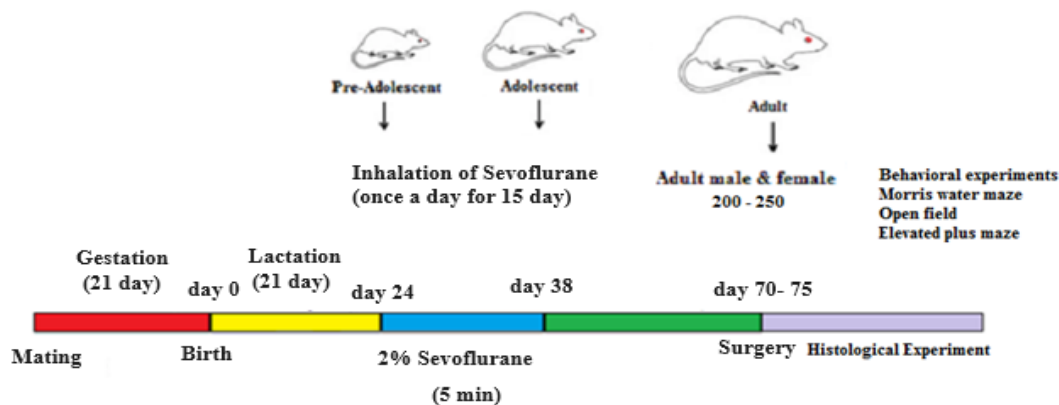
## مواد و روش ها

## حیوانات

برای مدل سازی از موش های صحرائی نر و ماده نژاد *Wistar 24* روزه با تجویز داروی بیهوشی سئوفلوران در ابتدای دوره نوجوانی بر اساس مطالعات انجام شده استفاده شد (۱۵). همان موش ها پس از بالغ شدن در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم (۲،۵ تا ۳ ماهه) جهت

انجام آزمایشات اصلی استفاده شدند. سن موش ها بر اساس مقالات مرتبط که دوره زمانی برای موش های صحرایی را تعیین کرده بودند، انتخاب شدند (۱۶-۱۸). حیوانات در حیوانخانه بیمارستان امام خمینی (ره) در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت  $2 \pm 22$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند. حیوانات به آب تصفیه شده شهری و غذای آماده (ساخت کارخانه خوراک دام پارس) دسترسی داشتند. حیوانات به طور تصادفی به گروه کنترل و گروه های آزمایش نر و ماده تقسیم شدند. تمامی آزمایشات در ساعات ۹ الی ۱۶ صورت می گرفت. پس از کراس حیوانات ماده و نر (حداقل ۳ موش ماده در هر گروه برای به دست آوردن تعداد مناسب زاده ها جهت هماوری گذاشته شدند و پس از تأیید بارداری، روز زایمان حیوان به عنوان روز صفر مدل سازی و انجام آزمایشات را نشان می دهد.

انجام آزمایشات اصلی استفاده شدند. سن موش ها بر اساس مقالات مرتبط که دوره زمانی برای موش های صحرایی را تعیین کرده بودند، انتخاب شدند (۱۶-۱۸). حیوانات در حیوانخانه بیمارستان امام خمینی (ره) در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت  $2 \pm 22$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند. حیوانات به آب تصفیه شده شهری و غذای آماده (ساخت کارخانه خوراک دام پارس) دسترسی داشتند. حیوانات به طور تصادفی به گروه کنترل و گروه های آزمایش نر و ماده تقسیم شدند. تمامی آزمایشات در ساعات ۹ الی ۱۶ صورت می گرفت. پس از کراس حیوانات ماده و نر (حداقل ۳ موش ماده در هر گروه برای به دست آوردن تعداد مناسب زاده ها جهت هماوری گذاشته شدند و پس از تأیید بارداری، روز زایمان حیوان به عنوان روز صفر



شکل (۱). طرح شماتیک مدل سازی و انجام آزمایش های اصلی در موش های نر و ماده

گروه های آزمایش (نر و ماده) از روز ۲۴ تا ۳۸ پس از تولد روزانه یکبار به مدت ۵ دقیقه با استنشاق سئوفلوران بیهوش شدند. برای این منظور موش ها در یک محفظه پلاستیکی قرار داده شده و سپس با استفاده از دستگاه بیهوشی (Bonther®, SP, Brazil)، سئوفلوران (Bremer pharma GMBH, Germany) با ۸ درصد جهت القای بیهوشی (برای یک دقیقه) صورت گرفته و سپس برای حفظ بیهوشی عمیق (در ۵ دقیقه آخر)، میزان سئوفلوران به همراه هوا/اکسیژن به عنوان حامل با جریان

### روش تجویز داروی بیهوشی

موش های نوزاد پس از دوره شیرخوارگی به مدت ۲۱ روز و سپس یک وقفه دوازده روزه برای سازگاری و اطمینان از تغذیه موش ها از غذای آماده برای انجام مداخلات بیهوشی آماده شدند. موش های نوجوان در روز ۲۳ پس از تولد به صورت تصادفی از مادرهای مختلف به چهار گروه تقسیم شدند که شامل گروه های نر و ماده کنترل (بی هیچ مداخله ای) و موش های گروه آزمایش نر و ماده (دریافت کننده سئوفلوران) بودند. سپس موش های

### ماز زمینه باز (OF) Open Field بررسی اضطراب و افسردگی

برای انجام این آزمون از یک جعبه رو باز که کف آن توسط خطوطی به چندین مربع مساوی تقسیم بندی شده بود، استفاده شد. جنس جعبه از پلکسی گلس به شکل مربع و دارای ابعاد ۵۰ در ۵۰ با ارتفاع ۵۰ سانتی متر بود، برای انجام آزمایش حیوان از یکی از چهار گوشه جعبه به داخل آن رها شده و اجازه یافت تا محیط را آزادانه به مدت ۵ دقیقه جستجو کند. در طول این مدت رفتار حیوان با استفاده از دوربین بالای جعبه، فیلم برداری شده و برای آنالیز حرکتی از برنامه Ethovision استفاده شد. مسافت طی شده توسط حیوان به عنوان شاخص فعالیت حرکتی و دفعاتی که حیوان روی پاهای عقب خود در محیط تست می ایستد (Reaning) به عنوان ارزیابی اضطراب حیوان مورد تحلیل قرار گرفت. بین هر بار آزمایش جعبه با الکل ۱۰ درصد تمیز شد. به منظور اجتناب از تأثیر ریتم شبانه روزی بر فعالیت حرکتی حیوان، تمام تست ها در ساعت مشخصی از روز انجام شد.

### ماز مربع مرتفع (EPM) Elevated Plus Maze بررسی اضطراب

محیط تست از چهار بازوی باز و بسته بر روی یک چهارپایه به ارتفاع ۴۰ سانتی متری سطح زمین تشکیل شده است. دو بازوی روبه روی هم با دیوارهای بلند و انتهای بسته، دالان تاریکی را به وجود آورده است و دو بازوی دیگر بدون دیواره هستند. تابش نور لامپ محیط در قسمت وسط و بازوهای باز بیشتر از بازوهای بسته بود. این شدت نور استرس حیوان را در ورود به بازوهای باز بیشتر می کند و حیوان سالم در حالت طبیعی زمان بیشتری را داخل بازوهای بسته صرف می کند. یک دوربین در بالا و مرکز به علاوه تعبیه شد تا حرکات موش به کامپیوتر منتقل و با نرم افزار Ethovision بررسی شود. مدت زمان سپری شده در بازوی باز، مدت زمان سپری شده در بازوی بسته و تعداد دفعات ورود به بازوی باز مورد ارزیابی قرار گرفت.

گاز ۲ لیتر در دقیقه به ۲ درصد کاهش یافت. برای تأیید بیهوشی عمیق، علائمی مانند بسته شدن پلک ها و قرمزی گوش ها و سایر اندام های خارجی پایش شد. بعد از پایان بیهوشی حیوانات به قفس خود منتقل شده و تا زمان هوشیاری کامل و حرکت آزادانه به حیوانخانه منتقل شدند. در تمام طول ۱۵ روز، مدت زمان به بیهوشی رفتن و مدت زمان به هوش آمدن حیوانات اندازه گیری شد و موش های نر و ماده مورد مقایسه قرار گرفتند. حیوانات همه گروه ها بعد از آخرین بیهوشی در روز ۳۸ و بعد از تولد به مدت ۳۰ تا ۳۵ روز تحت مراقبت قرار گرفته و برای انجام آزمایش های رفتاری آماده شدند. همچنین حیوانات در روزهای ۲۳، ۲۸، ۳۳ و ۳۸ به عنوان یک تغییر مورفولوژیکی مرتبط با افزایش سن توزین شدند.

### مطالعات رفتاری

#### بررسی حافظه فضایی با استفاده از ماز آبی موریس

این تست رفتاری طبق پروتکل ۴ روزه انجام شد. در سه روز اول یک سکوی غیرقابل رؤیت در ربع جنوب غربی تانک، حدود ۱،۵ سانتی متر زیر سطح آب قرار گرفت و جایگاه آن در طول این سه روز ثابت ماند. هر روز آموزش متشکل از ۴ کارآزمایی است و در هر کارآزمایی حیوان به گونه ای که صورتش به طرف دیوار حوضچه باشد، از یکی از چهار منطقه (شمال، جنوب، شرق یا غرب) در آب رها شد و به حیوان اجازه داده شد ۹۰ ثانیه شنا کرده تا سکوی پنهان شده را بیابد. پس از یافتن سکو به حیوان اجازه داده شد ۲۰ ثانیه روی آن بماند و سپس کارآزمایی بعدی آغاز می شد. پس از اتمام یادگیری حیوان با حوله خشک شده و به قفس بازگردانده می شد. در روز ۴ سکوی پنهان برداشته شده و به حیوان ۶۰ ثانیه زمان داده شد تا در تانک شنا کند. در طول این ۴ روز، تست ها توسط دوربین بالای تانک فیلم برداری شده و برای آنالیز از برنامه Ethovision استفاده شد. پارامترهای مهم در این تست: تأخیر در رسیدن به سکوی پنهان در مرحله یادگیری، تأخیر برای اولین ورود به محل سکوی پنهان و کل زمان صرف شده در منطقه هدف در مرحله به خاطر آوری بود.

## مطالعات بافت‌شناسی

مطالعات بافت‌شناسی بر روی نمونه‌های هیپوکامپ و کورتکس موش‌های صحرایی صورت گرفت. موش‌ها با دوز بالای کتامین (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیپوش شدند و با ۵۰ میلی‌لیتر نرمال سالین هپارینه و سپس با ۵۰ تا ۷۵ میلی‌لیتر محلول تثبیت‌کننده حاوی ۴ درصد پاراتورمالدئید در بافر فسفات (PBS) ۰٫۱ مولار (pH 7.4) پرفیوژن شدند. سپس مغزها از جمجمه خارج و در ظروف پلاستیکی در بسته محتوی محلول فرمالدئید ۱۰ درصد در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. از نمونه مغز حیوانات طی پردازش بافتی بلوک پرافین تهیه و بلوک‌ها با ضخامت ۷ میکرومتر برش داده شده و بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شدند. برای بررسی بقای نورون‌ها از رنگ‌آمیزی تولیدین بلو استفاده شد. شمارش نورون‌های عصبی در نواحی CA1 هیپوکامپ و کورتکس انجام شد. نورون‌های تیره (Dark Neurons (DNs) و سلول‌هایی با مرزهای سیتوپلاسمی قابل مشاهده و هسته روشن در شمارش گنجانده شدند. روند شمارش برای هر بخش دو بار تکرار شد. نورون‌های تیره بر اساس جمع‌شدگی نورونی، پیکنوز هسته‌ای، اتوزینوفیل سیتوپلاسمی و غیره، انتخاب و شمارش شدند.

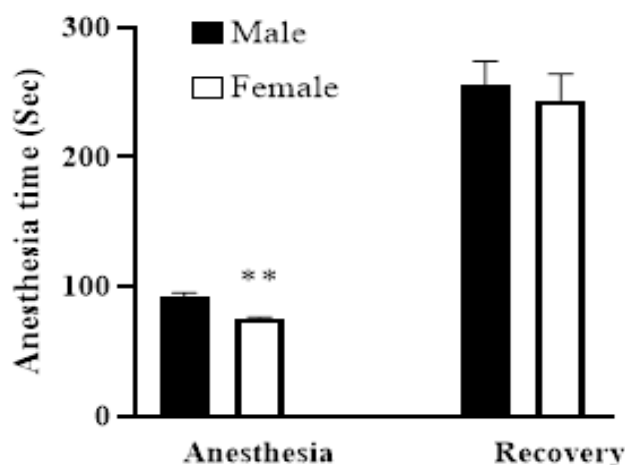
## تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Graph-Pad Prism نسخه ۸٫۰ برای ویندوز (نرم‌افزار Graph-Pad. ایالات متحده آمریکا) انجام شد. تفاوت‌های آماری با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه در فاز یادگیری آزمون موریس و آنالیز واریانس یک‌طرفه با تست تعقیبی Bonferroni برای سایر آزمایشات انجام شد. برای نشان‌دادن سنجش آماری مقادیر کمتر از ۰٫۰۵ در نظر گرفته شد. تمام مقادیر به‌صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شد.

## یافته‌ها

## مقایسه زمان بیپوشی و به هوش آمدن موش‌های نر و ماده گروه‌های تحت آزمایش

شکل ۲ مدت‌زمان به بیپوشی‌رفتن و به هوش آمدن حیوانات نر و ماده در گروه‌های تحت آزمایش را نشان می‌دهد. آنالیز Unpaired t-test در مورد به بیپوشی‌رفتن حیوانات در جنس‌های نر و ماده نشان داد که اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) در حیوانات نر در زمان بیپوش شدن نسبت به حیوانات ماده وجود دارد؛ با این حال با استفاده از آنالیز Unpaired t-test تفاوت معنی‌داری در زمان به‌هوش‌آمده حیوانات نر نسبت به حیوانات ماده مشاهده نشد.



شکل ۲) مدت‌زمان به بیپوشی

نش شدن و مدت‌زمان به

موش آمدن.

نتایج بیپوش شدن و مدت‌زمان به هوش آمدن به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. ( $P < 0.01$ )\*\* در مقایسه

حیوانات نر و ماده دریافت کننده سئوفلوران در زمان بیهوش شدن).

## مطالعات رفتاری

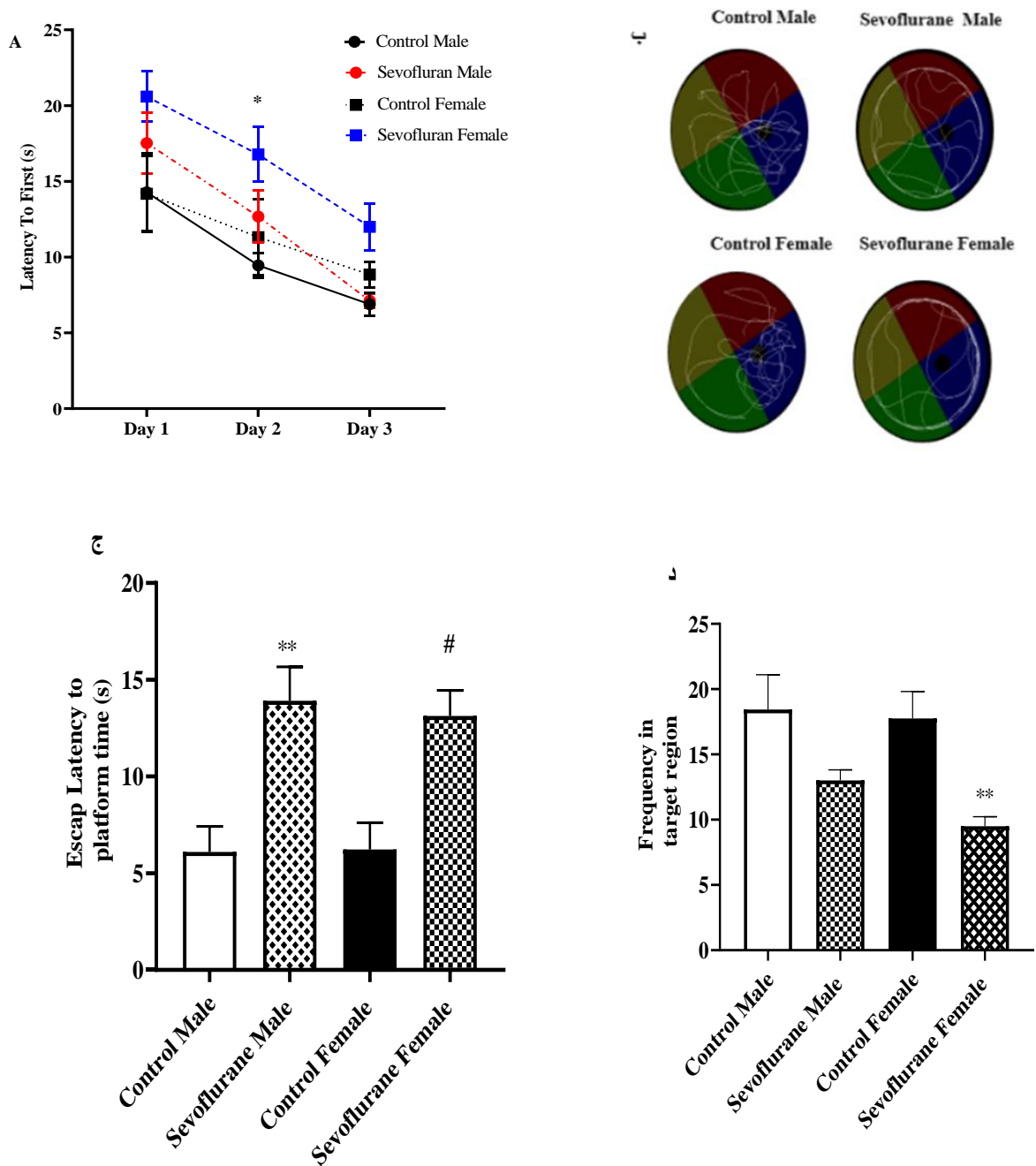
### ماز آبی موريس

شکل ۳ (الف) نتایج یادگیری در مرحله آموزش در ماز آبی موريس را نشان می دهد. تأخیر برای رسیدن به سکوی پنهان در مرحله یادگیری با آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی Bonferroni تجزیه و تحلیل شد. نتایج تأخیر برای رسیدن به سکوی پنهان در مرحله یادگیری نشان داد که تفاوت معنی داری در فاکتور روز و اختلاف درون گروه های مورد آزمایش وجود ندارد؛ با این حال بین روز و گروه های تحت بررسی تأثیر معنی داری مشاهده شد. این نتایج نشان داد که حیوانات مورد بررسی به خوبی محل سکوی پنهان را شناسایی کرده و در فاز یادگیری به درستی آموزش دیده اند. هنگامی که این تعامل با آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز شد، مشخص شد که حیوانات در گروه سئوفلوران ماده در مقایسه با گروه کنترل ماده در روز ۲ زمان بیشتری را برای رسیدن به سکوی مخفی صرف کرده اند و این زمان بیشتر از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0/05$ ) ( $n=7$ ). نمودار ۲ (ج و د) آزمون به خاطر آوری ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین را نشان می دهد. دو پارامتر تأخیر برای نخستین ورود به محل سکوی پنهان و تعداد دفعات ورود به منطقه ای که سکوی پنهان در آن قرار داشت مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه مشخص شد که یک اثر قابل توجه ناشی از سئوفلوران بر زمان تأخیر در اولین ورود به محل سکوی پنهان وجود دارد. تست تعقیبی Bonferroni تأیید کرد که حیوانات نر و ماده گروه های دریافت کننده سئوفلوران در اولین ورود به محل سکوی پنهان در مقایسه با گروه های کنترل تأخیر بیشتری داشتند و این تأخیر از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0/01$ ) برای موش های نر و  $P < 0/05$  برای موش های ماده) نتایج ما همچنین نشان داد که تعداد دفعات ورود به منطقه

قرارگیری سکوی پنهان در حیوانات گروه دریافت کننده سئوفلوران نر و ماده کمتر از حیوانات گروه های کنترل نر و ماده بود. با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Bonferroni مشخص شد که این تعداد کمتر در گروه حیوانات نر دریافت کننده سئوفلوران نسبت به گروه کنترل نر دارای تفاوت معنی داری است ( $P < 0/01$ ) ( $n=7$ )

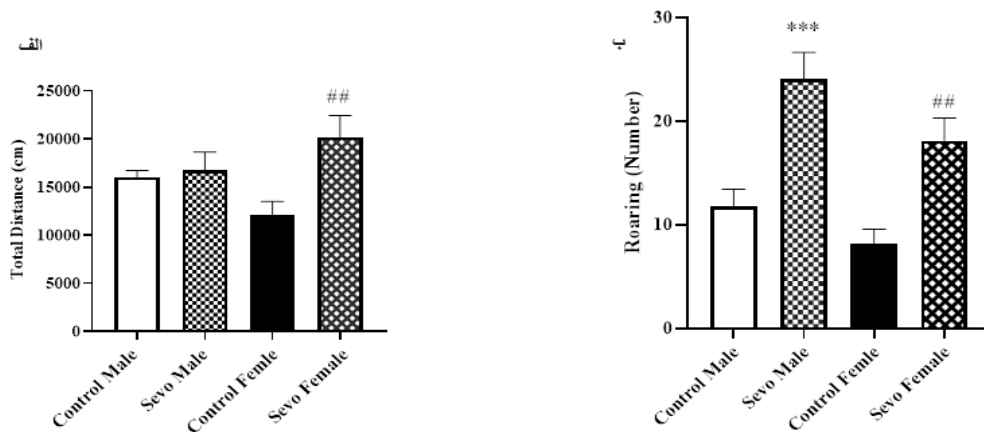
### آزمون زمینه باز

نتایج ما نشان داد که استفاده مکرر از سئوفلوران می تواند موجب افزایش مسافت طی شده توسط موش های بالغ در ماز زمینه باز شود. و این افزایش مسافت طی شده در حیوانات ماده نسبت به گروه کنترل ماده معنی دار بود. ( $P < 0/01$ ) با این حال تفاوت معنی داری بین گروه ماده دریافت کننده سئوفلوران با گروه نر دریافت کننده سئوفلوران وجود نداشت. نتایج ما همچنین نشان داد که استفاده مکرر از سئوفلوران در دوران نوجوانی می تواند باعث افزایش اضطراب در دوران بزرگسالی حیوانات شود به طوری که در موش های نر و ماده گروه سئوفلوران تعداد دفعات ایستادن حیوانات بر روی پای عقبی در دستگاه آزمون زمینه باز به طور معنی داری افزایش یافته بود ( $P < 0/01$ ) برای حیوانات نر و ( $P < 0/01$ ) برای حیوانات ماده در مقایسه با گروه کنترل) که بیانگر افزایش اضطراب حیوانات بود.



شکل ۳. اثر مواجهه مکرر با سئوفلوران بر حافظه فضایی در ماز آبی مورس. الف) توانایی موش‌های صحرایی بالغ برای یافتن سکوی پنهان و تأخیر در یافتن آن در فاز آموزش طی سه روز متوالی؛ ب) مسیر و مدت‌زمان حرکت موش‌های صحرایی هر گروه در منطقه هدف و سکوی پنهان؛ ج) ارزیابی حافظه حیوان در فاز به خاطر آوری با استفاده از اندازه‌گیری زمان تأخیر در یافتن محل سکوی پنهان و د) تعداد دفعات ورود حیوان به منطقه‌ای که سکوی پنهان در آن قرار داشت، در موش‌های نر و ماده دریافت‌کننده سئوفلوران در مقایسه با گروه کنترل. تمام نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است ( $P < 0.01$ )\*\* در مقایسه حیوانات نر و ماده و  $P < 0.05$  # در مقایسه حیوانات ماده دریافت‌کننده سئوفلوران با گروه کنترل نر و ماده).



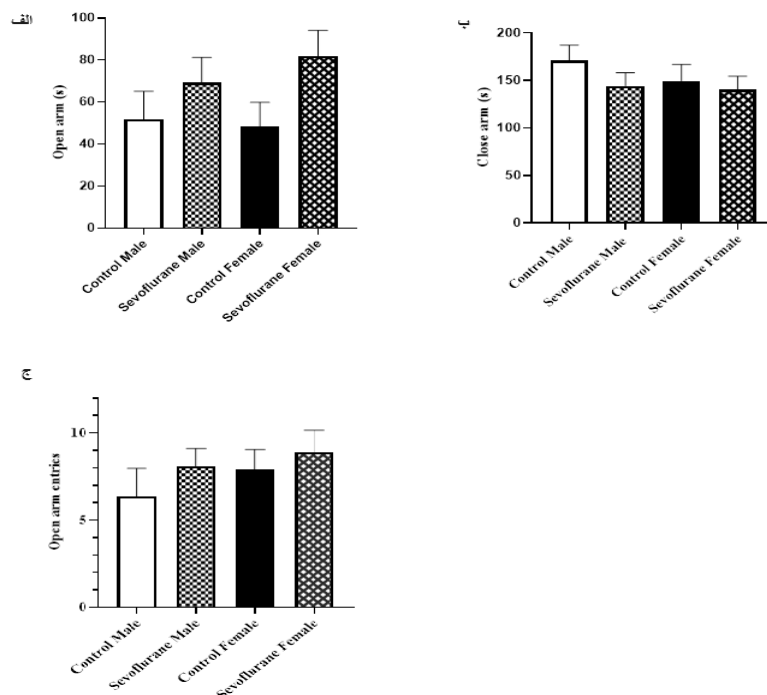


شکل ۴. اثر مواجهه مکرر با سئوفلوران بر مسافت طی شده (الف) و ایستادن بر روی پاهای عقبی (ب) در ماز زمینه باز در توزیع موش‌های صحرایی نژاد ویستار دریافت‌کننده سئوفلوران بر اساس جنس در مقایسه با گروه‌های کنترل هر دو جنس. تمام نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است ( $P < 0.001$  <sup>\*\*\*</sup> در مقایسه حیوانات نر دریافت‌کننده سئوفلوران با گروه کنترل نر). <sup>##</sup>  $P < 0.01$  حیوانات ماده.

موش‌های گروه کنترل بود. همچنین مدت‌زمان قرارگیری در بازوی بسته در موش‌های گروه سئوفلوران نر و ماده نسبت به گروه کنترل نر و ماده کمتر بود. با این حال تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه مشخص کرد که این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود.

### آزمون ماز مربع مرتفع

شکل ۵ بررسی اضطراب در مواجهه مکرر با سئوفلوران را در آزمون ماز مرتفع نشان می‌دهد. نتایج ما نشان داد که زمان ماندن موش‌های گروه سئوفلوران نر و ماده در بازوهای باز و تعداد ورود آنها به بازوی باز بیشتر از

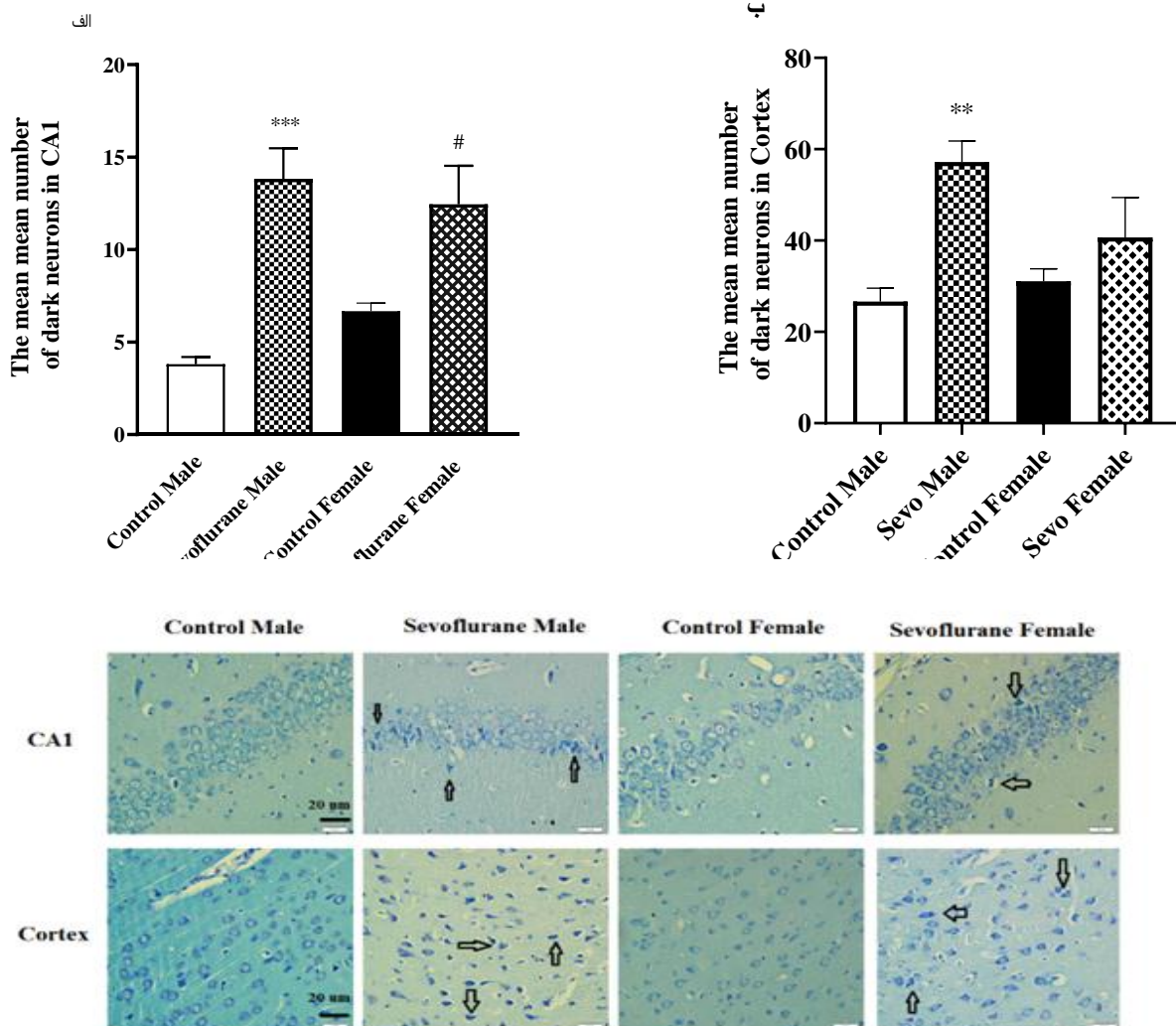


شکل ۵. اثر مواجهه مکرر با سئوفلوران بر مدت‌زمان ماندن موش در بازوی باز (الف) مدت‌زمان ماندن موش در بازوی بسته (ب) و تعداد دفعات ورود موش‌ها به بازوهای باز (ج) در ماز مربع مرتفع در توزیع موش‌های صحرایی نژاد ویستار دریافت‌کننده سئوفلوران بر اساس جنس در مقایسه با گروه‌های کنترل هر دو جنس. تمام نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است.

### آسیب بافتی

شکل ۶ میانگین تعداد نورون‌های تیره را در ناحیه‌های CA1 و کورتکس نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود تنها تعداد کمی DN در نواحی هیپوکامپ و کورتکس در گروه کنترل (نر و ماده) یافت شد، اما در گروه‌های سئوفلوران، DN در واحد سطح در CA1 هیپوکامپ و کورتکس افزایش یافت. واریانس یک‌طرفه با تجزیه و تحلیل تست تعقیبی Bonferroni نشان داد که میانگین تعداد نورون‌های تیره در ناحیه CA1 در گروه‌های

سئوفلوران نر و ماده در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش قابل توجهی دارد ( $P < 0,001$ ) برای موش‌های نر و ( $P < 0,05$ ) برای موش‌های ماده). همچنین میانگین تعداد نورون‌های تیره در ناحیه کورتکس در گروه‌های سئوفلوران نر در مقایسه با گروه‌های کنترل نر تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0,01$ ). نتایج ما در موش‌های بالغ نشان می‌دهد که قرار گرفتن مکرر در معرض سئوفلوران در نر و ماده در زمان نوجوانی باعث مرگ سلولی در ناحیه هیپوکامپ و کورتکس می‌شود.



شکل ۶ (الف و ب) میانگین تعداد نورون‌های تیره در CA1 هیپوکامپ و کورتکس گروه نر ماده کنترل و توزیع موش‌های صحرایی نژاد ویستار دریافت‌کننده سئوفلوران بر اساس جنس ( $P > 0,01$ ) # حیوانات ماده، ( $P > 0,001$ ) \* و ( $P > 0,01$ ) \* در مقایسه حیوانات نر دریافت‌کننده سئوفلوران با گروه کنترل (ج) ارزیابی بافت‌شناسی، از ظاهر نورون‌هایی با هسته‌های تیره رنگ‌آمیزی متراکم و سیتوپلاسم آنوزینوفیلیک روشن برای شناسایی آسیب عصبی در ناحیه CA1 و کورتکس. تمام نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است.

## بحث

مطالعه حاضر نشان داد که قرارگرفتن مکرر در معرض داروی بیهوشی سووفلوران در دوره ابتدای نوجوانی یا نوجوانی می تواند اثرات بلندمدتی را بر رفتارهای اضطرابی و حافظه حیوان در دوره بزرگسالی بگذارد. همچنین یافته های بافت شناسی این مطالعه نشان داد که سووفلوران می تواند به بافت هیپوکامپ و کورتکس موش آسیب رسانده و تعداد نورون های تیره این نواحی را افزایش دهد. سووفلوران، یک بی حس کننده فرار و متداول ترین داروی بیهوشی مورد استفاده در کودکان و نوجوانان است اما آسیب های رفتاری و شناختی ناشی از تجویز سئوفلوران در سال های اخیر کانون تحقیقات قابل توجهی بوده و در حال حاضر ایمنی آن را به یک موضوع مهم بهداشتی تبدیل کرده است. مطالعات در جوندگان نشان داده اند که مواجهه مکرر با سئوفلوران به عنوان یک داروی بیهوشی استنشاقی ممکن است اثرات نوردژنراتیو در تکامل مغز و دوره های بعد از آن داشته باشد در تحقیق حاضر نیز ما اثرات جانبی بلندمدت سئوفلوران را از جنبه استفاده آن در بیهوشی عمومی در کودکان و نوجوانان مورد ارزیابی قرار داده ایم. در چند سال گذشته مطالعات متعددی در مورد تجویز سووفلوران به صورت تک دوز یا چند دوز با دوزهای کم یا زیاد برای بلندمدت یا کوتاه مدت گزارش شده است (۱۰، ۱۱، ۱۹)، با توجه به اینکه مدت زمان جراحی اطفال اغلب کوتاه است، ما در این مطالعه حداقل غلظت آلئولی (MAC) Minimum Alveolar Concentration 2 درصد را برای موش های نوجوان انتخاب کرده و سووفلوران را برای ۱۵ روز با همین غلظت تکرار کردیم. طبق برخی مقالات اخیر، یک دوز واحد از سووفلوران برای ایجاد تغییرات رفتاری کافی نیست، اما برخی از مطالعات منطبق با مطالعه ما نشان داده اند که قرارگرفتن در معرض چندین دوز مختلف از سووفلوران با نقص یادگیری همراه خواهد بود (۶، ۲۰، ۲۱).

در مطالعه حاضر در مورد زمان بیهوش شدن موش ها، نتایج ما نشان داد که موش های ماده نوجوان زودتر از نرهای نوجوان بیهوش می شوند. برای توجیه این تفاوت بایستی به مسئله فیزیولوژی حیوانات نر و ماده توجه داشت و با توجه به روند بیهوشی ۱۵ روزه، علی رغم اینکه موش های نر نسبت به موش های ماده وزن گیری بیشتری داشتند اما حیوانات ماده نسبت به حیوانات نر دیرتر بیهوش شدند. لازم به ذکر است که این زمان در به هوش آمدن حیوانات تفاوتی نداشته و با توجه به سایر نتایج به نظر می رسد که تأثیری بر با این حال، این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

نتایج رفتاری ما در ارتباط با حافظه و استفاده از آزمون آبی موریس نشان داد که تجویز سئوفلوران در دوران نوجوانی و نوجوانی می تواند موجب تأخیر در رسیدن به سکوی پنهان هم در فاز آموزش و هم در فاز به خاطر آوری شود، همچنین نتایج ما نشان داد که تعداد دفعات ورود حیوان به محل سکوی پنهان در فاز به خاطر آوری در موش های نر و ماده دریافت کننده سووفلوران کمتر از حیوانات گروه کنترل بود. اثر نوروتوکسیک سووفلوران ممکن است مغز در حال رشد را مختل کند و بر یادگیری و حافظه طولانی مدت در حیوانات تأثیر بگذارد (۲۲، ۲۳). یافته های ما نشان داد که یادگیری و اختلال حافظه ناشی از سووفلوران در موش های صحرایی نر و ماده نوجوان با نتایجی که قبلاً در مقالات برای نقص های حافظه وابسته به هیپوکامپ ناشی از قرارگرفتن در معرض سووفلوران گزارش شده بود، مطابقت دارد. قرارگرفتن در معرض سووفلوران در نوزادان باعث آسیب شناختی بلندمدت از جمله از دست دادن حافظه و اضطراب می شود (۲۴). در مطالعه ای وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳، با استفاده از ماز آبی موریس نشان دادند که موش های ۷ روزه ای که به مدت ۴ ساعت در معرض ۲٫۵ درصد سئوفلوران قرار گرفتند، اختلالات حافظه و یادگیری فضایی قابل توجهی را نشان می دهند (۱۳). در سال ۲۰۲۲، محققان دریافتند که

قرارگرفتن در معرض سووفلوران نوزادان از طریق تنظیم متابولیک هیپوکامپ ممکن است باعث اختلال عصبی رفتاری در موش های نوجوان شود (۲۵). لی و همکارانش (۲۰۱۹) با استفاده از تست ماز آبی موریس نشان دادند که بیهوشی با سووفلوران در موش های نوزاد روزه به مدت ساعت در روز به مدت سه روز متوالی منجر به ناهنجاری های رفتاری خفیف در مراحل بعدی زندگی می شود (۲۶). زنگ و همکاران در سال ۲۰۱۳، تجویز سئوفلوران را با درصدهای متفاوت و مدت زمان های افزایشی به موش های صحرایی نوزاد بررسی کردند و به اختلالات رفتاری در استفاده از ماز آبی موریس و ماز زمینه باز در موش های بالغ پی بردند (۲۷). با این حال این تغییرات در برخی مطالعات وجود نداشت به طوری که ژیاولی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه شان نوزاد موش صحرایی را در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از تولد به مدت ۲ ساعت در معرض ۲٫۶ درصد سووفلوران قرار داده و در سنین نوجوانی و بزرگسالی، حافظه فضایی موش ها را با استفاده از تست ماز آبی موریس (MWM) مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که قرارگرفتن مکرر در معرض ۲٫۶ درصد سووفلوران در اوایل زندگی منجر به ناهنجاری های رفتاری مشخصی نمی شود. بر اساس این نتایج به نظر می رسد، سن و میزان تجویز دارو به حیوان و مدت زمان گرفتن تست بعد از تجویز داروی بیهوشی می تواند در اختلالات رفتاری تعیین کننده باشد (۲۸).

نتایج ما در استفاده از ماز زمینه باز نشان داد که تجویز سووفلوران در دوره نوجوانی موجب اختلال حرکتی در حیوانات بالغ نمی شود اما می تواند اضطراب حیوانات را تحت تأثیر قرار دهد. در اینجا ما نشان داده ایم که موش های بالغ که در دوران نوجوانی سووفلوران دریافت کرده بودند در مقایسه با موش های کنترل در موقعیت های اضطراب آور و استرس زا رفتارهای اضطرابی از خود نشان داده و استرس و اضطراب ناشی از اثرات بلندمدت سئوفلوران توانسته علاوه بر حافظه فضایی حیوان بر رفتار

اضطرابی آنها نیز تأثیر گذارد. اگرچه از نظر آماری این تفاوت در ماز مرتفع معنی دار نبود اما در مجموع در کنار نتایج ماز زمینه باز در رابطه با طول مسافت طی شده و رفتار ایستادن بر روی پاهای عقبی حیوانات دریافت کننده سئوفلوران، می توان نتیجه گرفت که در هر دو جنس رفتارهای اضطرابی حیوانات مشهود بود. این نتایج نیز با نتایج سایر پژوهش ها مطابقت داشت. ساتوموتو و همکاران در سال ۲۰۰۹، موش های شش روزه C57BL/6 به مدت ۶ ساعت در معرض سئوفلوران ۳ درصد قرار دادند و دریافتند که وقتی در معرض داروی سئوفلوران قرار می گیرند نه تنها باعث نقص یادگیری، بلکه باعث ایجاد رفتارهای اجتماعی غیرطبیعی مشابه اختلال طیف اوتیسم می شوند. (۱۴). نتایج مطالعه حاضر در مورد افزایش نورون های تیره و مرگ سلول های عصبی در ناحیه هیپوکامپ و کورتکس مغز نشان داد که تجویز سووفلوران در دوران قبل از نوجوانی می تواند اثرات بلندمدتی را طی تکامل و مراحل بعد از آن داشته باشد، به طوری که این اثرات سبب افزایش مرگ نورونی در نواحی مختلف مغز موش های صحرایی بالغ شده و این مرگ نورونی می تواند عملکرد مغز را دچار اختلال کند، چنانکه این اختلال در نتایج ما در رابطه با مطالعات رفتاری کاملاً مشهود است. چندین مطالعه قبلی بر روی سمیت عصبی سووفلوران متمرکز شده اند (۲۹)، قرارگرفتن طولانی مدت با سووفلوران ممکن است رشد سلول های گرانول پیش ساز در مرحله آخر را در شکنج دنداندار هیپوکامپ مختل کند و منجر به اختلالات شناختی ناشی از آپوپتوز فعال شده با اتوفازی از طریق فعال سازی NF-kB شود (۳۰). قرارگرفتن طولانی مدت در معرض سووفلوران می تواند به نورون ها آسیب برساند و شناخت را در موش های مسن مختل کند. اختلال حافظه ناشی از سووفلوران در موش های پیر ممکن است با آپوپتوز عصبی ناشی از استرس شبکه آندوپلاسمی (ER) نیز مرتبط باشد (۲۱)، (۳۱). دونگ و همکاران در سال ۲۰۰۹، در مطالعه ای نشان

حافظه و اضطراب و استرس شود. سووفلوران همچنین می تواند سبب مرگ سلولی در ناحیه هیپوکامپ و کورتکس مغز افراد بالغ شود یعنی مراکز از مغز که با حافظه و شناخت در ارتباط هستند. نتایج این پژوهش می تواند در اختیار علوم بالینی قرار گرفته تا پزشکان بتوانند در رابطه با تجویز سووفلوران به عنوان داروی بیهوشی، اثرات جانبی آن را مد نظر قرار داده و بهترین تصمیم را اتخاذ کنند.

### ملاحظات اخلاقی

این آزمایش به تأیید کمیته پژوهش و اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران رسید (کد اخلاق: IR.TUMS.NI.REC.1400.015).

### تشکر و قدردانی:

از پژوهشکده علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تهران بابت تأمین تجهیزات و منابع مالی این مطالعه تشکر و قدردانی می شود.

### تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

دادند که تجویز سئوفلوران ۱۲ ساعت بعد از تجویز سووفلوران به مدت ۲ ساعت می تواند سبب القای آپوپتوز در بافت مغز موش (Mice) و کاهش فعالیت آنزیم تخریب کننده پیش ساز بتا آمیلوئید شده و به همین دلیل سبب افزایش تجمع پروتئین های بتا آمیلوئید و القای بیشتر آپوپتوز شود. یانگ و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که قرار گرفتن در معرض سئوفلوران بدون جراحی یا هیچ مداخله ای می تواند علاوه بر اختلالات عصبی-رفتاری منجر به تغییراتی در الگوهای متیلاسیون DNA در سلول های موش های بالغ شده و اثرات بلندمدتی را سبب شود (۳۲). علاوه بر این مکانیسم های مولکولی نیز نشان داده اند که سووفلوران از طریق آبشار آپوپتوز تعدیل شده توسط فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در مغز موش های جوان در حال رشد باعث ایجاد نوروپتوز می شود (۳۳، ۳۴)، و این اثرات نهایتاً در عملکرد رفتاری بروز می کنند.

### نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که قرار گرفتن مکرر در معرض سووفلوران در دوره پیش نوجوانی و نوجوانی می تواند اثرات بلندمدتی بر رفتار و بافت مغز حیوانات بالغ بگذارد؛ به طوری که سبب اختلالات رفتاری مانند از دست رفتن

### منابع

1. Yang HK, Chung DS, Hwang JM. The effect of general anesthesia and strabismus surgery on the intellectual abilities of children: a pilot study. *American Journal of Ophthalmology* 2012;153(4):609-13.
2. Brambrink AM, Evers AS, Avidan MS, Farber NB, Smith DJ, Zhang X, et al. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the neonatal rhesus macaque brain. *Anesthesiology* 2010;112(4):834-41.
3. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benschhoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *Journal of Neuroscience* 2003;23(3):876-82.
4. Nikizad H, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. Early exposure to general anesthesia causes significant neuronal deletion in the developing rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences journal* 2007;1122:69-82.
5. Kanaya A. Emergence agitation in children: risk factors, prevention, and treatment. *Journal of Anesthesia* 2016;30(2):261-7.
6. Lerman J, Sikich N, Kleinman S, Yentis S. The pharmacology of sevoflurane in infants and children. *Anesthesiology* 1994;80(4):814-24.
7. Fan CH, Peng B, Zhang FC. The postoperative effect of sevoflurane inhalational anesthesia on cognitive function and inflammatory response of pediatric patients. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2018;22(12):3971-5.
8. Xu L, Shen J, Yu L, Sun J, McQuillan PM, Hu Z, et al. Role of autophagy in sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal rat hippocampal cells. *Brain Research Bulletin* 2018;140:291-8.

9. Patel SS, Goa KL. Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia. *Drugs* 1996;51(4):658-700.
10. Makaryus R, Lee H, Feng T, Park JH, Nedergaard M, Jacob Z, et al. Brain maturation in neonatal rodents is impeded by sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 2015;123(3):557-68.
11. Amrock LG, Starner ML, Murphy KL, Baxter MG. Long-term effects of single or multiple neonatal sevoflurane exposures on rat hippocampal ultrastructure. *Anesthesiology* 2015;122(1):87-95.
12. Chen C, Shen FY, Zhao X, Zhou T, Xu DJ, Wang ZR, et al. Low-dose sevoflurane promotes hippocampal neurogenesis and facilitates the development of dentate gyrus-dependent learning in neonatal rats. *American Society for Neurochemistry* 2015;7(2).
13. Wang SQ, Fang F, Xue ZG, Cang J, Zhang XG. Neonatal sevoflurane anesthesia induces long-term memory impairment and decreases hippocampal PSD-95 expression without neuronal loss. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2013;17(7):941-50.
14. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, Imaki J. Neonatal Exposure to Sevoflurane Induces Abnormal Social Behaviors and Deficits in Fear Conditioning in Mice. *The American Society of Anesthesiologists, Anesthesiology* 2009; (110):628-37.
15. Fahanik babaei J, Jafarian M, Adeli S, Barzegar behrooz A, Pestehei SK. Cognitive Impairments Induced by Repeated Sevoflurane Exposure During Pre-adolescence in Adult Male and Female Rats: Involvement of Biochemical, Histological and Neuroplasticity Approaches. *Journal of Cellular & Molecular Anesthesia* 2023;8(4):231-45.
16. Spear L. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health* 2000;24(2):115-23.
17. Spear LP. Adolescent brain development and animal models. *Annals of the New York Academy of Sciences journal* 2004;1021:23-6.
18. Spear LP, Brake SC. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Developmental Psychobiology* 1983;16(2):83-109
19. Shen X, Liu Y, Xu S, Zhao Q, Guo X, Shen R, et al. Early life exposure to sevoflurane impairs adulthood spatial memory in the rat. *Neurotoxicology* 2013;39:45-56.
20. Kaya Z, Sogut E, Cayli S, Suren M, Arici S, Karaman S, et al. Evaluation of effects of repeated sevoflurane exposure on rat testicular tissue and reproductive hormones. *Inhalation Toxicology* 2013;25(4):192-8.
21. Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Xia W, Marcantonio ER, et al. The common inhalational anesthetic sevoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels. *Archives of neurology* 2009;66(5):620-31.
22. Tagawa T, Sakuraba S, Kimura K, Mizoguchi A. Sevoflurane in combination with propofol, not thiopental, induces a more robust neuroapoptosis than sevoflurane alone in the neonatal mouse brain. *Journal of Anesthesia* 2014;28(6):815-20.
23. Liu F, Rainosek SW, Frisch-Daiello JL, Patterson TA, Paule MG, Slikker W Jr, et al. Potential Adverse Effects of Prolonged Sevoflurane Exposure on Developing Monkey Brain: From Abnormal Lipid Metabolism to Neuronal Damage. *Toxicological Sciences* 2015;147(2):562-72.
24. Jimenez-Tellez N, Pehar M, Visser F, Casas-Ortiz A, Rice T, Syed NI. Sevoflurane Exposure in Neonates Perturbs the Expression Patterns of Specific Genes That May Underly the Observed Learning and Memory Deficits. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24(10).
25. Wang Y, Li H, Zhao Y, Qin F, Wang L, Jiang L, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces adolescent neurobehavioral dysfunction by interfering with hippocampal glycerophospholipid metabolism in rats. *Cerebral Cortex* 2023;33(5):1955-71.
26. Li Y, Liu L, Tian Y, Zhang J. Rapamycin improves sevoflurane induced cognitive dysfunction in aged rats by mediating autophagy through the TLR4/MyD88/NF kappaB signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 2019;20(4):3085-94.
27. Zheng H, Dong Y, Xu Z, Crosby G, Culley DJ, Zhang Y, et al. Sevoflurane anesthesia in pregnant mice induces neurotoxicity in fetal and offspring mice. *Anesthesiology* 2013;118(3):516-26.
28. Liang X, Zhang Y, Zhang C, Tang C, Wang Y, Ren J, et al. Effect of repeated neonatal sevoflurane exposure on the learning, memory and synaptic plasticity at juvenile and adult age. *American Journal of Translational Research* 2017;9(11):4974-83.
29. Shen Q, Jiang Y, Jia X, Zhou X, Zhou QH. Amelioratory Effect of Melatonin on Cognition Dysfunction Induced by Sevoflurane Anesthesia in Aged Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2022;21(1):e133971.
30. Tong D, Ma Z, Su P, Wang S, Xu Y, Zhang LM, et al. Sevoflurane-Induced Neuroapoptosis in Rat Dentate Gyrus Is Activated by Autophagy Through NF-kappaB Signaling on the Late-Stage Progenitor Granule Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2013;8(2):e57870.
31. Chen G, Gong M, Yan M, Zhang X. Sevoflurane induces endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in hippocampal neurons of aging rats. *PLoS One* 2013;8(2):e57870.
32. Yang Z, Tong Y, Brant JO, Li N, Ju LS, Morey TE, et al. Dexmedetomidine Diminishes, but Does Not Prevent, Developmental Effects of Sevoflurane in Neonatal Rats. *Anesthesia & Analgesia* 2022;135(4):877-87.
33. Hu X, Hu X, Huang G. LncRNA MALAT1 is

- involved in sevoflurane-induced neurotoxicity in developing rats. *J Cell Biochem.* 2019;120:18209-18.
34. Yu Z, Wang J, Wang H, Wang J, Cui J, Junzhang P. Effects of sevoflurane exposure during late pregnancy on brain development and beneficial effects of enriched environment on offspring cognition. *Cell Mol Neurobiol.* 2020b;40:1339-52.