

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Biologijos bakalauro studijų programos IV kurso studentė

Brigita Danilovaitė

Bakalauro baigiamasis darbas

Laboratorinių žiurkių (*Wistar*) jauniklių ultragarsinių vokalizacijų tyrimas

Darbo vadovas:

Prof. dr. Osvaldas Rukšėnas

Vilnius 2020

TURINYS

Santrupos.....	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Gyvūnų komunikacija.....	6
1.1.1. Elgsena.....	6
1.2. Garsas ir klausa.....	7
1.2.1. Ultragarso paplitimas gyvūnų pasaulyje.....	10
1.3. Žiurkių ultragarsinės vokalizacijos.....	13
1.3.1. 22 kHz dažnio vokalizacijos.....	14
1.3.2. 50 kHz dažnio vokalizacijos.....	15
1.3.3. 40 kHz dažnio jauniklių vokalizacijos.....	16
1.3.4. Lytiniai skirtumai.....	19
1.4. USV generavimo mechanizmai.....	20
1.4.1. 22 kHz dažnio USV generacija.....	20
1.4.2. 50 kHz dažnio USV generacija.....	20
1.4.3. Gerklų vaidmuo USV generavime.....	22
2. METODIKA.....	24
2.1. Tyrimo objektas.....	24
2.2. Tyrimo eiga.....	25
2.3. Įrašų analizė.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	34
3.1. Jauniklių svorių prieaugis.....	34
3.2. Duomenų skirstinio normalumo prielaidos tikrinimas.....	35
3.3. Vokalizacijų skaičius.....	37
3.4. Vidutinė vokalizacijų trukmė.....	38
3.5. Vidutiniai vokalizacijų dažniai.....	39
3.6. Vidutinis dažnių juostos plotis.....	41
IŠVADOS.....	42
REKOMENDACIJOS.....	43
SANTRAUKA.....	44

SUMMARY.....	45
PADĒKOS.....	46
LITERATŪRA.....	47
1 Priedas.....	53

Santrupos

AGL – anogenitalinės srities laižymas (nuo angl. *anogenital licking*);

AMCS – kylanti mezolimbinė cholinerginė sistema (nuo angl. *ascending mesolimbic cholinergic system*);

DA – dopaminerginė sistema (nuo angl. *dopaminergic system*);

FM - dažnio moduluojami garsai (nuo angl. *frequency modulation*);

LTD – šoninis nugarinis dangčio branduolys (nuo angl. *laterodorsal tegmental nucleus*);

USV – ultragarsinės vokalizacijos (nuo angl. *ultrasonic vocalizations*);

VTA - pilvinė dangčio sritis (nuo angl. *ventral tegmental area*).

IVADAS

Gyvūnų karalystėje komunikacija ir elgsena yra vienos svarbiausių dedamųjų, nuo kurių priklauso individo ar grupės gyvenimo kokybė bei rūšies išlikimas. Didžioji dalis gyvūnų komunikuoja mums girdimais garsais, tačiau kiti, dėl savo gyvenimo būdo ypatybių naudoja ultragarsinius signalus. Sveikas žmogus girdi svyravimus nuo 16 Hz iki 20 kHz. Garsai esantys virš 20 kHz dažnio ribos vadinami ultragarsu. Ultragarą šikšnosparniai ir dantytųjų banginių pobūrio žinduoliai naudoja echolokacijai (Thomas et al., 2004). Tuo tarpu graužikams (žiurkėms, pelėms, žiurkėnams) ultragarsas yra vidurūšinė komunikacijos priemonė, kurios dėka šie smulkūs žinduoliai buriasi į grupes, perspėja vieni kitus apie pavojų ir išreiškia savo emocinę būseną. Tyrimais įrodyta, jog įvairių dažnių ultragarsinės vokalizacijos turi reikšmę ir yra svarbios graužikų tarpusavio santykiams (S. M. Brudzynski, 2009).

Žiurkės yra nepaprastai socialūs gyvūnai, demonstruojantys įvairias sudėtingas elgesio formas tokias kaip agresija, žaismingumas, poravimosi elgsena bei tėvų rūpinimasis palikuoniais (Brown and Riede, 2017, p. 150). Žiurkių ultragarsinės vokalizacijos yra skirstomos į 3 pagrindinius tipus: suaugusių žiurkių 22 kHz ir 50 kHz dažnio vokalizacijos bei jauniklių 40 kHz dažnio vokalizacijos (S. M. Brudzynski, 2009).

Geriausiai ištirti suaugusių žiurkių skleidžiami signalai, tačiau ne mažiau svarbūs yra ir žiurkių jaunikliai. Įvairiose literatūriniuose šaltiniuose pateikiamos skirtingos jauniklių USV klasifikacijos ir ypatybės konkrečiomis dienomis po gimimo. Literatūroje nėra nuoseklių duomenų apie žiurkių jauniklių ultragarsinių signalų kitimą per 21 dieną nuo gimimo. Taip pat, nėra vieningo sutarimo kokie yra sveikų žiurkių jauniklių vokalizacijų parametrų lytiniai skirtumai.

Darbo tikslas – ištirti *Wistar* linijos žiurkių jauniklių ultragarsines vokalizacijas (USV) nuo 1 iki 21 dienos po gimimo.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti ultragarsinių vokalizacijų parametrų kitimą per 21 dieną nuo gimimo:
 - 1.1. USV skaičius;
 - 1.2. vidutinė vokalizacijų trukmė;
 - 1.3. vidutinis vokalizacijų dažnis;
 - 1.4. vidutinė vokalizacijų dažnių juosta.
2. Ištirti ultragarsinių vokalizacijų parametrų skirtumus tarp lyčių.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Gyvūnų komunikacija

Bendravimas yra neatsiejama žmonių kasdienio gyvenimo dalis, tačiau retai susimąstome, jog aplink mus esantys gyvūnai taip pat bendrauja tarpusavyje. Čarlzas Darvinas 1872 m. išleistoje knygoje „The Expression of Emotions in Man and Animals“ moderniai aprašė gyvūnų bendravimą, emocijų reiškimą bei evoliuciją ir tarprūšines homologijas (Ekman, 2006). Tačiau Darvino idėjos nebuvo pripažintos to meto mokslininkų dėl stebėjimų stygiaus ir prireikė beveik šimtmečio, kad daugelis knygoje aprašytų hipotezių būtų patvirtintos.

Žvelgiant iš evoliucijos perspektyvos bendravimas turi svarbią reikšmę socialiniam gyvenimui ir išgyvenimui. Gyvūnų emocijų ar kitaip „emocinės būsenos“ išreiškimas tapo puikiu įrankiu, palengvinančiu gyvūnų tarpusavio santykių kūrimą ir būrimąsi į socialines grupes. Įvairios emocinės išraiškos formos gali būti nukreiptos vidurūšiniu lygiu, pavyzdžiui patinams kovojant dėl patelės, motinai besirūpinant savo jaunikliais, įvairūs poravimosi ritualai. Arba tarprūšiniu lygiu, kai stojama į akistatą su plėšrūnu (Brudzynski, 2017). Svarbu paminėti, jog gyvūnų bendravimas dažniausiai yra kompleksiškas ir apima visus sensorinius modalumus: akustinius, regimuosius, cheminius, elektrinius ir lytėjimo signalus. Skirtingų signalų kombinacijos ir jų panaudojimas priklauso nuo gyvūno rūšies, norimos perduoti žinutės reikšmės bei aplinkos sąlygų (Naguib, 2006).

1.1.1. Elgsena

Gyvūnų komunikacija yra glaudžiai susijusi su elgsena. Gyvūnų elgsena yra labili, tai užtikrina įvairių rūšių išgyvenimą keičiantis aplinkos sąlygoms. XX amžiaus pabaigoje atsirado didelis susidomėjimas gyvūnų elgesio modeliais ir jų asmenybės tyrimais, kurie tęsiasi iki šiol (Kairys and Liniauskaitė, 2014).

Skirtumai tarp žmonių apibūdinami asmenybės tipais, gyvūnijos pasaulyje šie skirtumai tarp individų vadinami „pajėgumu susidoroti“ (angl. *coping styles*), temperamentu, elgesio tendencijomis, modeliais ar sindromais (angl. *behavioural syndrome*) (Sih et al., 2004). Kalbant apie gyvūnus vis dar nėra priimtina sakyti, jog jie turi asmenybes, todėl norint išvengti antropomorfizmo - žmogiškųjų savybių priskyrimo gyvūnams (Horowitz and Bekoff, 2007), buvo įvestos anksčiau paminėtos sąvokos. Gyvūno „asmenybė“ ar elgesio sindromas

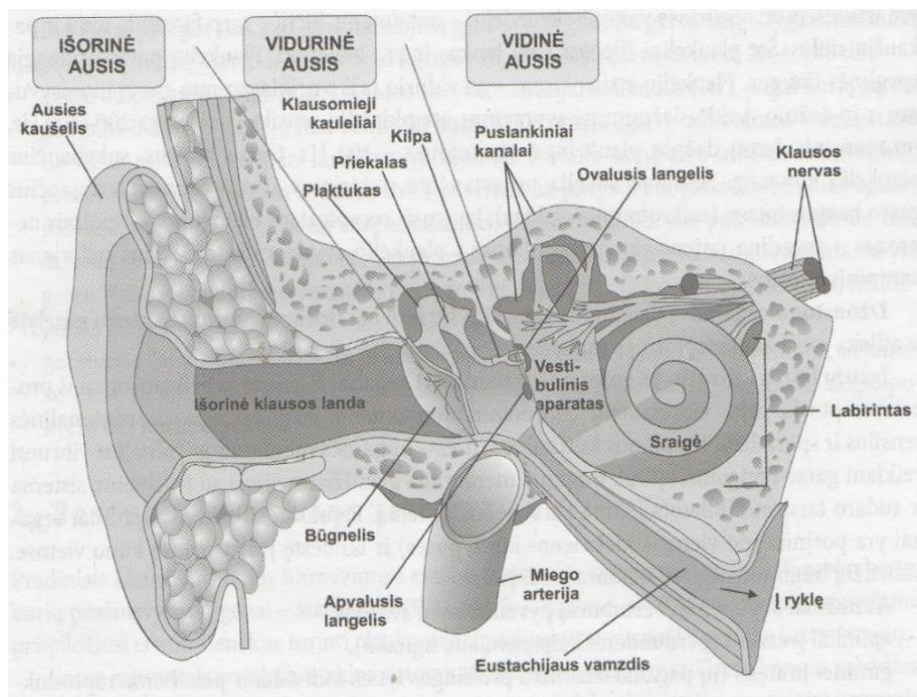
apibrėžiamas kaip „tarpusavyje susiję elgesio modeliai, atspindintys individo elgsenoje esant skirtingoms sąlygoms“, pavyzdžiui individas agresyvus arba ne (Simon and Hodson, 2019).

Nepaisant kiekvieno gyvūno individualių savybių, yra klasikiniai elgsenos modeliai būdingi visiems gyvūnų karalystės individams. Pirmasis yra „kovok arba bėk“, tai aktyvus atsakas apibūdinantis teritorijų kontrolę ar agresiją. Antrasis „išsaugok arba pasitrauk“, apibūdina gyvūno sustingimą ar paklusnumą (Bolles, 1970; Koolhaas et al., 1999). Vidurūšiniu lygmeniu elgsena pasako labai daug apie grupės narių tarpusavio santykius: motinos rūpestis savo jaunikliais, įvairūs poravimosi ritualai, patinų kova dėl patelės ir kt.

1.2. Garsas ir klausa

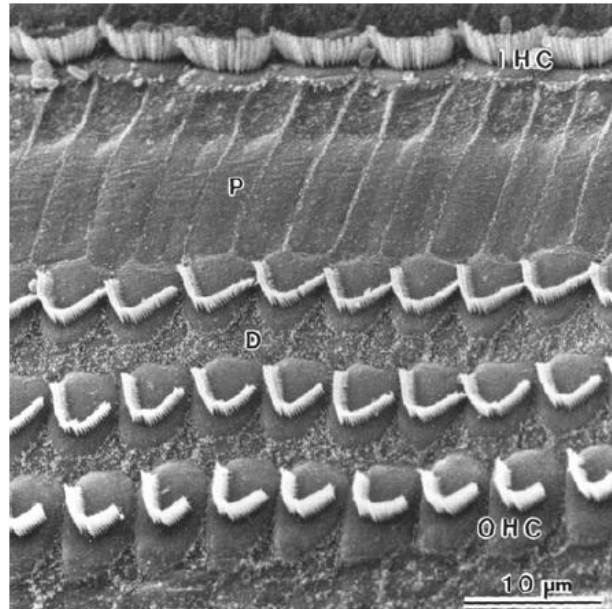
Garsas tai mechaninės bangos, kurioms skliti reikia tam tikros tamprios terpės. Bangos gali skliti dujose, skysčiuose ir kietuosiuose kūnuose, išskyrus vakuumą (Butrimienė J. et al., 2003, p. 60). Žmogus girdi svyravimus nuo 16 Hz iki 20 kHz. Garsas, kurio dažnis yra iki 16 Hz vadinamas infragarsu, virš 20 kHz – ultragarsu. (Evers and Haak, 2010)

Stuburiniai gyvūnai (žinduoliai) taip pat ir žmogus turi kone geriausiai išsivysčiusią klausos sistemą. Funkciniu ir anatominio požiūriu stuburinių ausį galima suskirstyti į tris pagrindines dalis – išorinę, vidurinę ir vidinę (1.1. pav.).

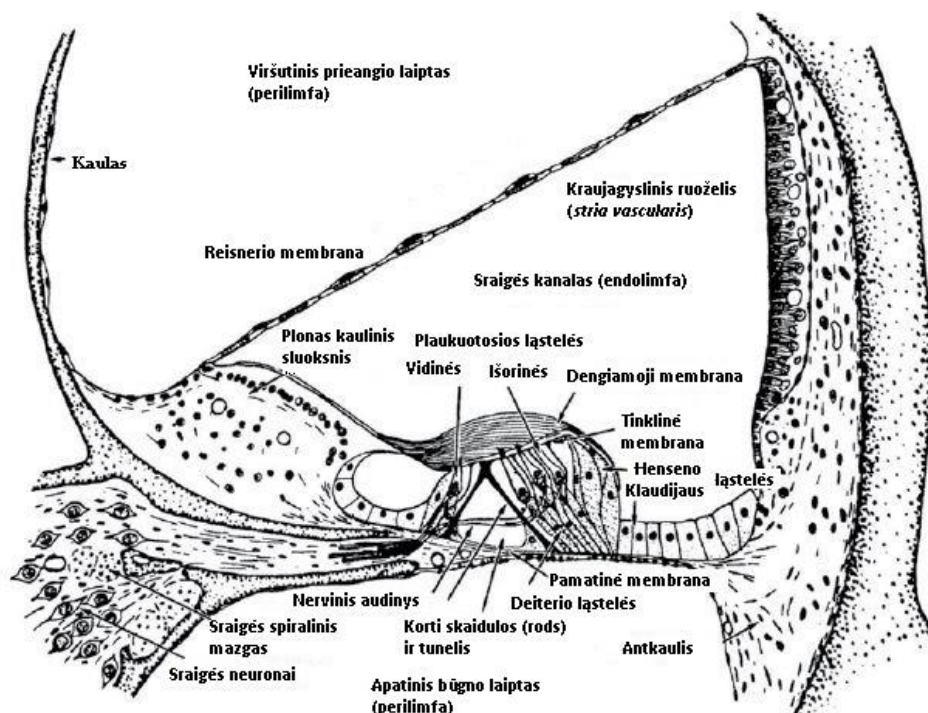


1.1. pav. Žinduolio ausies sandara (Rukšėnas Osvaldas, Griksienė Ramunė, 2007).

Išorinė ausis nukreipia garsą į vidurinę ausį, vidurinė ausis savo ruožtu atlieka signalo sustiprinimo ir perdavimo, taip pat apsauginę funkcijas. Vidinės ausies darinyje sraigėje vyksta garso bangų transdukcijos procesai, kurių metu garsas virsta nerviniu signalu, pasiekiančiu smegenyse esančius klausos centrus. Garso bangų transdukcijos procesuose labai svarbios plaukuotosios ląstelės (1.2. pav). Jos aptinkamos sraigėje esančiame Korti organe (1.3. pav).

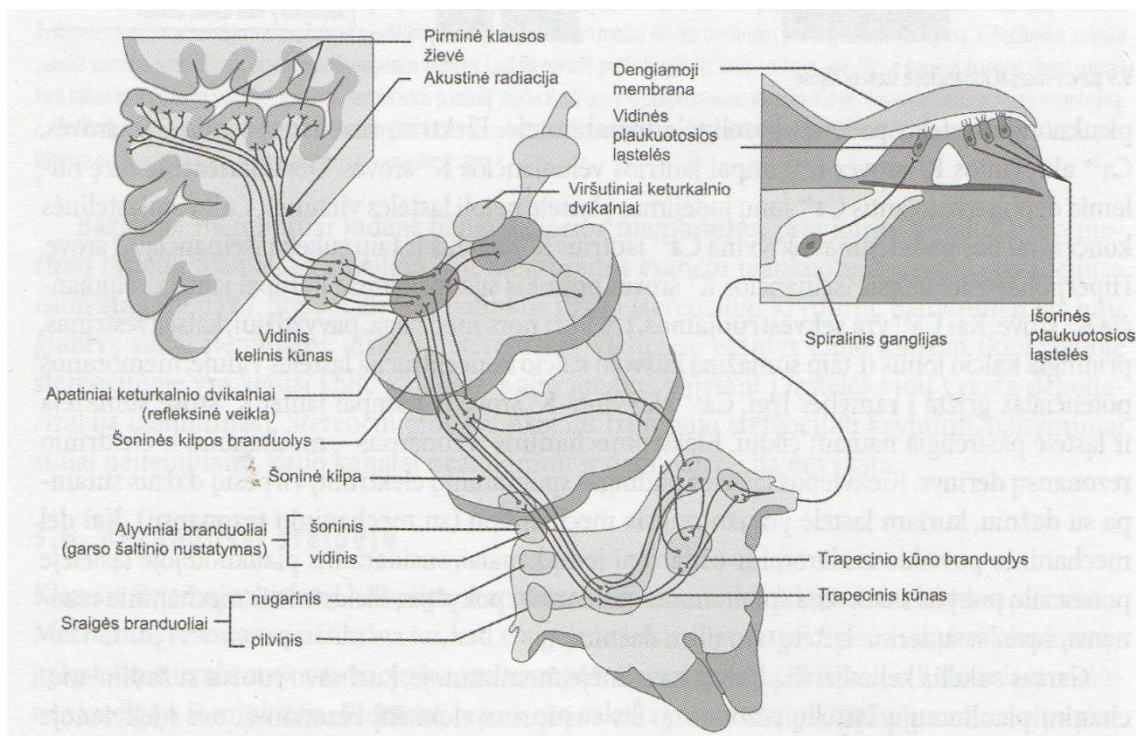


1.2. pav. Skenuojančio elektroninio mikroskopo mikrografija, vaizduojanti dalį beždžionės Korti organo su pašalinta dengiamąja membrana, jog būtų matoma plaukuotųjų ląstelių organizacija. Nuo viršaus į apačią pavaizduota: viena eilė IHC (angl. *inner hair cells*) - vidinės plaukuotosios ląstelės, P (angl. *pillar cells*) – atraminės stulpinės ląstelės, 3 eilės OHC (angl. *outer hair cells*) – išorinės plaukuotosios ląstelės ir D (angl. *Deiter's cells*) – atraminės falanginės ląstelės (Møller, 2006, p. 13).



1.3. pav. Korti organo skerspjūvis (pagal Gelfand, 2017, p. 41).

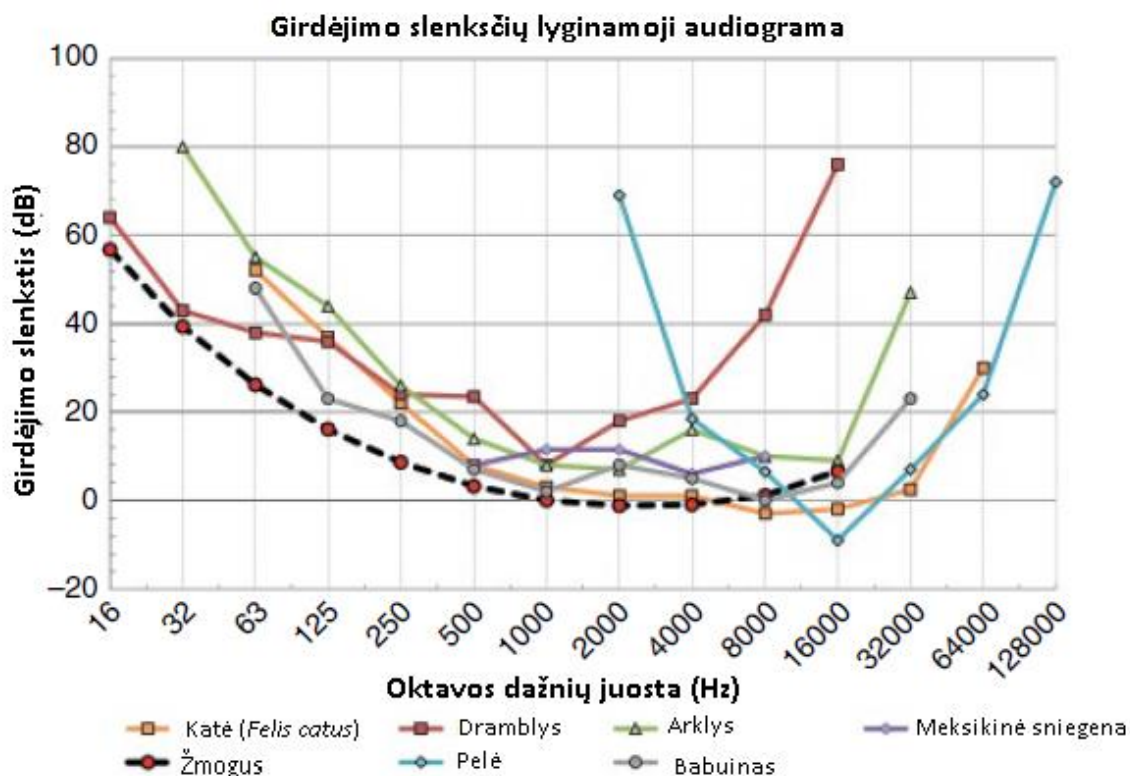
Stereocilijos išsidėsčiusios didėjimo tvarka ir tarpusavyje sujungtos ekstraląstelinėmis siūlinėmis jungtimis. Garso sukeltos bangos sužadina plaukuotųjų ląstelių rezonansą, mažesnės stereocilijos linksta didėjimo tvarka link didžiausios stereocilijos, plaukeliams susiliečiant atidaromi joniniai kanalai, stimuliuojamos aferentinio nervo skaidulos (Svirskis Gytis, 2007, p. 125). Iš sraigės nerviniai impulsai keliauja aštuntuoju (klausos ir pusiausvyros) nervu į smegenų kamieną (Alberti, 2006). Į galvos smegenų žievines sritis signalai perduodami per keletą darinių: spiralinį gangliją, sraigės branduolį, viršutinius alyvinius branduolius, šoninės kilpos branduolius, apatinius dvikalnius ir vidinį kelinį kūną, kol yra pasiekama klausos žievė (Rukšėnas Osvaldas, Griškienė Ramunė, 2007) (1.4. pav.)



1.4. pav. Klausos sistemos projekcijos galvos smegenyse (Rukšėnas Osvaldas, Griškienė Ramunė, 2007).

1.2.1. Ultragarso paplitimas gyvūnų pasaulyje

Ultragarsas – tai garsas, kurio dažnis prasideda nuo 20 kHz. Žmogus šio dažnio garsų deja negirdi (Møller, 2006, p. 300), tačiau girdi daugelis gyvūnų (1.5. pav.).



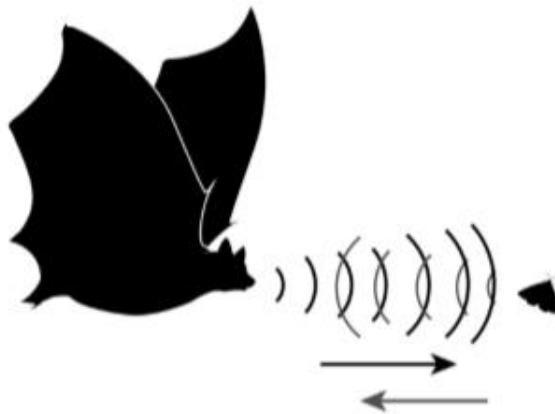
1.5. pav. Žinduolių girdėjimo spektrų audiograma. Ordinačių ašis žymi gyvūnų klausos slenksčius decibelais (dB), abscisių ašis žymi girdimą dažnį hercais (Hz) (pagal Dorey, 2019, p. 74).

Evoliucijos eigoje susiformavo, kad dėl skirtingų gyvenimo būdo ypatybių, daugelis gyvūnų ultragarsą naudoja savo poreikiams patenkinti. Šikšnosparniams, delfinams bei kai kuriems paukščiams ultragarsas suteikia informaciją apie aplink esančius objektus – tai vadinama echolokacija. Echolokacija – tai procesas, kurio metu gyvūnas skleidžia akustinius signalus tam, kad iš grįžtančių aidų gautų informacijos apie jį supančią aplinką (Au et al., 2000, p. 364). Graužikai ultragarsą naudoja kaip vidurūšinę komunikacijos priemonę. Tolimesnėje apžvalgoje smulkiau aprašomos ultragarso panaudojimo ypatybės.

Echolokuojantys šikšnosparniai turi gerai išvystytą trimatę akustinę atvaizdavimo sistemą, kuria jie naudojasi ieškodami maisto, siekdami išvengti kliūčių bei orientacijai visiškoje tamsoje. Taip pat, turi specializuotą klausos sistemą. Vienas iš tokios specializacijos pavyzdžių yra didžiojo pasagnosio šikšnosparnio (*Rhinolophus ferrumequinum*) klausos sistema. Šie šikšnosparniai girdi garsus nuo 9 kHz iki 96 kHz diapazone, tačiau daugiau nei

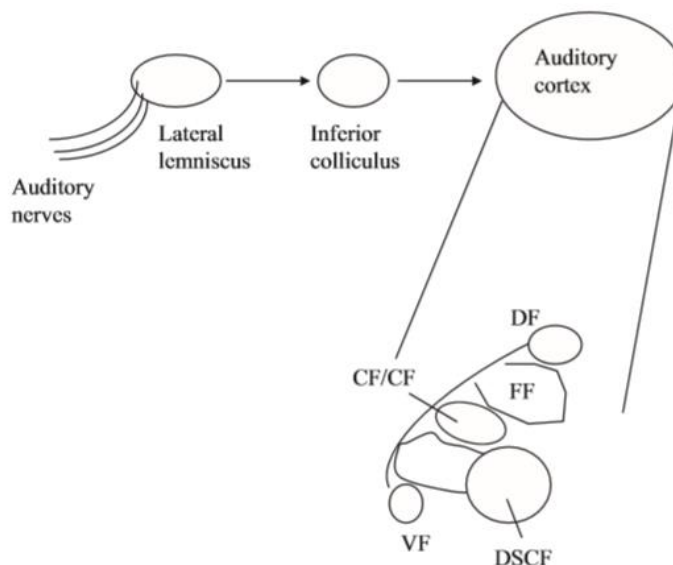
16% jų klausos neuronų yra pritaikyti nuo 83 kHz iki 84,5 kHz dažnių diapazonui. Tai reiškia, jog šiame garsų diapazone jie gali itin tiksliai atskirti dažnių skirtumus, kas puikiai pasitarnauja echolokacijoje (Au et al., 2000, p. 157).

Šie skraidantys žinduoliai skleidžia trumpus, intensyvius ultragarsinius signalus ir apdoroja informaciją, gaunama iš grįžtančių signalų, kad nustatytų atspindėtų objektų vietą, dydį ir formą (Wohlgemuth et al., 2016) (1.6. pav.).



1.6. pav. Scheminis šikšnosparnio echolokacijos vaizdas. Paveiksle vaizduojama kaip nuo objekto atsispindi šikšnosparnio skleidžiami ultragarsiniai signalai (pagal (Yovel and Greif, 2018)).

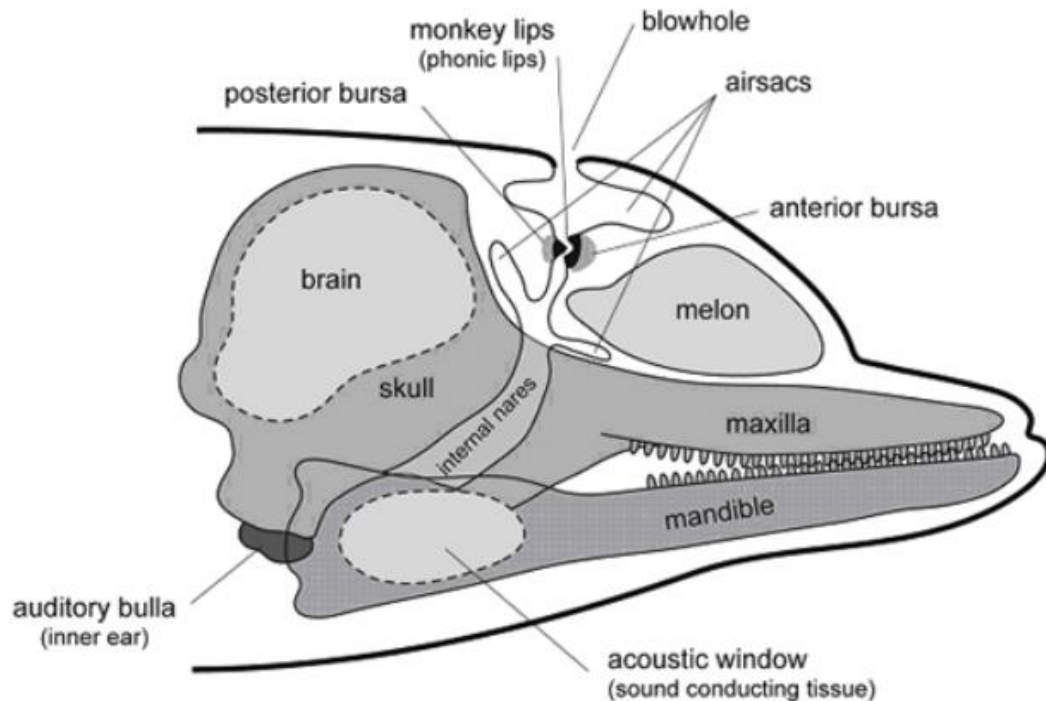
Šikšnosparnių ultragarsinių signalų skleidimo mechanizmas, priklausomai nuo rūšies, yra paremtas oro srauto sukeltomis balso stygų vibracijomis. Garsai yra sukuriami esant labai stipriam spaudimui po balso stygomis (angl. *subglottal pressure*). Kai kurie šikšnosparniai garsus sukuria spragsėdami liežuvium (Commins, 2018). Grįžtančių signalų priėmimas vyksta aidams perėjus per ausų kanalus ir toliau keliaujant į galvos smegenų kamieną, vidurines smegenis, gumburo branduolius ir pirminę klausos žievę, kur vyksta gautų signalų apdorojimas (Moss, 2018). Šikšnosparnių klausos žievė yra padalyta į keletą sričių, kurias sudaro specializuoti neuronai, kurie reaguoja į skirtingus garso elementus (1.7. pav.). Skirtingose srityse aptinkami: „FM neuronai“, reaguojantys į užlaikymą tarp nusklidusio dažniu moduluojamo (FM) signalo ir grįžtančio aido, „CF neuronai“ (nuo angl. *constant frequency*) – pastovaus dažnio neuronai, kurių dėka yra gaunama informacija apie greitį, daugiausia klausos žievės apimanti sritis yra Doplerio poslinkio – pastovaus dažnio (DSCF), kurios dėka reaguojama į dažnio pokyčius, ši savybė yra itin svarba echolokacijoje (Commins, 2018).



1.7. pav. Scheminis, anatominio garso priėmimo kelio nuo sraigės iki klausos žievės, vaizdas. Schemoje vaizduojama: *auditory nerve* – klausos nervas, *lateral lemniscus* – šoninė kilpa, *inferior colliculus* – apatinis dvikalnis, *auditory cortex* – klausos žievė, DF (*dorsal fringe*) – nugarinis pakraštys, FF (*for frequency*) – į dažninį užlaikymą reaguojanti sritis, CF (*constant frequency*) – pastovaus dažnio neuronų sritis, VF (*ventral fringe*) – pilvinis pakraštys, DSCF (*Doppler-shifted constant frequency*) – Doplerio poslinkio-pastovaus dažnio sritis (Commins, 2018).

Dantytųjų banginių (*Odontoceti*) pobūrio jūriniai žinduoliai taip pat naudoja ultragarsą echolokacijai bei komunikacijai. Pobūriui priklauso 7 šeimos: delfininiai, kašalotiniai, jūrų kiaulės, snapuotieji banginiai, Gango delfinai, upiniai delfinai ir narvaliniai. Banginiai ir delfinai skleidžia didelę įvairovę skirtingų signalų tipų, kurie prasideda nuo 15 Hz (tokio dažnio signalus skleidžia mėlynieji banginiai ir finvalai) iki signalų viršijančių 100 kHz, kuriuos echolokacijos metu skleidžia daugelis dantytųjų banginių (Au et al., 2000). Delfinai garsinius signalus generuoja nosies komplekso užpakalinėje dalyje esančių struktūrų - „akustinių lūpų“ (angl. *phonic lips*) ir porinių priekinės ir užpakalinės bursų (angl. *anterior and posterior bursa*) dėka (Perrin et al., 2009, pp. 348–349) (1.8. pav.). Priekinė ir užpakalinė bursos – tai maži poriniai riebaliniai kūneliai, sudarantys garsų generavimo kompleksą kartu su akustinėmis lūpomis. Manoma, jog garsai susidaro vibruojant šiems riebaliniams kūneliams (Huggenberger et al., 2009). Susidarę garsai atsispindi į kaukolę, o nuo jos signalai pereina per kaktoje esančius riebalinius audinius, kurie bendrai vadinami melonu. Ultragarsiniai signalai perėję meloną patenka į išorę (Thomas et al., 2004, p. 30). Jautriausia garsų priėmimui vieta delfinų galvoje – apatinis žandikaulis. Jis ypatingas tuo, jog jame yra specialus „akustinis riebalinis audinys“,

kuris randamas abiejuose žandikaulio pusėse bei ribojasi su tiesiai už apatinio žandikaulio esančiais ausų kauliukais. Grįžtančių aidų priėmimas vyksta signalui tiesiogiai keliaujant iš vandens per apatiniam žandikaulyje esantį riebalinį kanalą į akustinį langelį, perduodantį garsą į vidinę ausį (Au et al., 2000, pp. 276–278).



1.8. pav. Schematinis delfino galvos struktūrų vaizdas. Paveiksle pavaizduota: porinės struktūros *posterior bursa* – užpakalinė bursa ir *anterior bursa* – priekinė bursa, *phonic lips* – „akustinės lūpos“, *blowhole* – pūtimo anga, *airsacs* – oro ertmės, *brain* – smegenys, *melon* – melonas, *skull* – kaukolė, *internal nares* – nosies ertmė, *maxilla* – viršutinis žandikaulis, *mandible* – apatinis žandikaulis, *acoustic window* – akustinis langelis, *inner ear* – vidinė ausis (Marulanda, 2018).

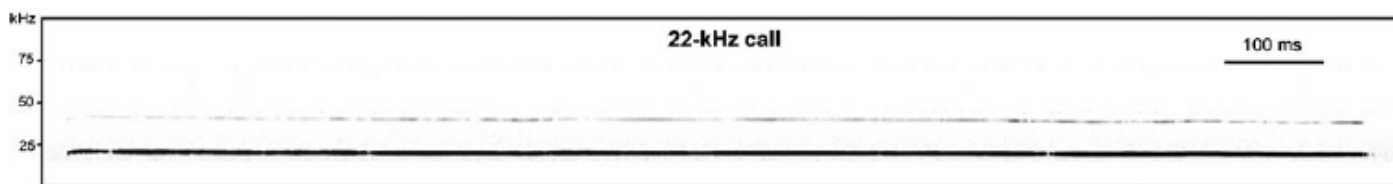
1.3. Žiurkių ultragarsinės vokalizacijos

Ultragarsinės vokalizacijos (angl. *Ultrasonic vocalizations*) – graužikų (žiurkių, pelių, žiurkėnų) vidurūšinės komunikacijos forma. 1960 metais tapo plačiai prieinami detektoriai, skirti fiksuoti šikšnosparnių ultragarsą. Pradėjus plačiai taikyti detektorius ir daugiau domėtis ultragarsu, to meto mokslininkai atrado, kad ir žiurkės geba skleisti bei girdėti ultragarsą (S. M. Brudzynski, 2009). Skiriami keli vokalizacijų tipai: jauniklių 40 kHz dažnio ir suaugusių žiurkių 22 kHz bei 50 kHz dažnio. Vokalizacijos nėra girdimos žmonėms, kadangi jų dažniai yra 20 kHz – 96 kHz diapazone (Brudzynski, 2018, 2005).

1.3.1. 22 kHz dažnio vokalizacijos

Žiurkių vokalizacijos tiesiogiai priklauso nuo aplinkos sąlygų. 22 kHz vokalizacijos atspindi negatyvią, aversyvią (ang. *aversive state*) emocinę būklę. Dažniausiai patinams būdingas vokalizavimas ejakuliacijos, tarprūšinių santykių metu, kai yra poreikis gintis ar paklusti dominuojančiam grupės nariui. Abiejų lyčių individai skleidžia 22 kHz dažnio garsus susidūrę su plėšrūnais, jausdami lėtinį skausmą, ar paveikti narkotinių medžiagų, tokių kaip opiatai ar kokainas (Stefan M. Brudzynski, 2009). Naujausių mokslinių straipsnių duomenimis vokalizacijos fiksuojamos ir tada, kai graužikas dar nesusidūrė su pavojumi, tačiau jį numato, remiantis aplinkos stebėjimu (Brudzynski, 2019). Reikėtų pabrėžti, kad graužikai dažniausiai vokalizuoja netoliese esant kitiems grupės nariams, tai tarsi perspėjimo mechanizmas. Apibendrinant, galima teigti, jog šios vokalizacijos pasireiškia tik esant stresinėms, nerimą keliančioms situacijoms.

22 kHz dažnio vokalizacijos – tai dažnių pikų vidurkis, kuris varijuoja diapazone nuo 18 kHz iki 32 kHz (Blanchard et al., 1991). Kitų autorių teigimu patenka į intervalą nuo 20 kHz iki 30 kHz (Poel and Miczek, 1991; Simola and Granon, 2018). Įvairių šaltinių duomenimis aversyvių vokalizacijų trukmė svyruoja nuo 300 ms iki 3400 ms (Brudzynski et al., 1993; Portfors, 2007; Takahashi et al., 2010). 22 kHz dažnio signalai apibūdinami kaip ilgi, turintys siaurą dažnių juostos plotį (1-6 kHz), todėl jie vadinami plokščiais (angl. *flat*) (1.9. pav.).

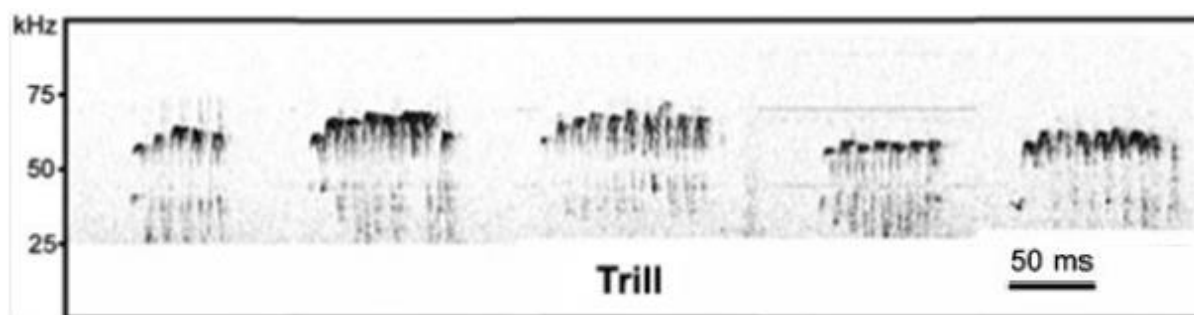


1.9. pav. 22 kHz dažnio vokalizacijų sonograma. Abscisių ašyje nurodomas laiko mastelis (ms), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz) (Wright et al., 2010).

1.3.2. 50 kHz dažnio vokalizacijos

50 kHz dažnio signalų emisija, taip pat kaip ir 22 kHz dažnio, priklauso nuo aplinkos sąlygų. Žinoma, kad 50 kHz dažnio garsai atspindi žiurkių pozityvią emocinę būseną (Barker, 2018). Šiuo atveju vokalizacijos nėra naudojamos kaip perspėjimo signalai, o veikiau kaip vidurūšinis socializacijos įrankis. Šio dažnio vokalizacijas abiejų lyčių žiurkės skleidžia per lytinę sueitį kopuliacinio periodo metu (Barfield et al., 1979), žaisdamos arba „žaismingos kovos“ metu (angl. *playful fighting*), parodydamos savo pozityvų nusiteikimą kito grupės nario atžvilgiu (Pellis et al., 2018). Taip pat žiurkės pozityviomis vokalizacijomis atsako į kutenimus ir paglostymus. Burgdorf J. et al., 2017 atliktas tyrimas parodė, jog reguliarus žaidimas su žiurkėmis, jų kutenimas, padidina graužikų atsparumą stresui (Burgdorf et al., 2017).

50 kHz dažnio vokalizacijų dažnių pikai gali svyruoti 35 kHz - 70 kHz intervale (Blanchard et al., 1993), arba siekti net 96 kHz dažnį. Šie signalai yra trumpi nuo 30 ms iki 50 ms, siauras dažnių juostos plotis, kuris svyruoja nuo 1 kHz iki 7 kHz (Portfors, 2007). 50 kHz dažnio garsai yra skirstomi į du tipus: „plokštieji“ ir „dažnio moduluojami“ – FM (nuo angl. *frequency modulation*) (Ahrens et al., 2009). Kai kurie mokslininkai mano, jog FM signalai reiškia bendrą gerą emocinę būseną, o plokštieji signalai dažniau skleidžiami esant teigiamam socialiniam kontaktui su kitais tos pačios rūšies individais (Mulvihill and Brudzynski, 2018). Tačiau yra įrodymų, jog žiurkių paaugliai skleidžia FM signalus socialinių kontaktų, o tiksliau tarpusavio žaidimų metu (Mulvihill and Brudzynski, 2018). FM signalai savo ruožtu dar smulkiau skirstomi į 15 kategorijų, priklausomai nuo jų akustinių charakteristikų (1 priedas). Tačiau dažniausiai pasitaikantys yra vibracijas primenantys signalai (angl. *trill*) (Wright et al., 2010) (1.10. pav.).

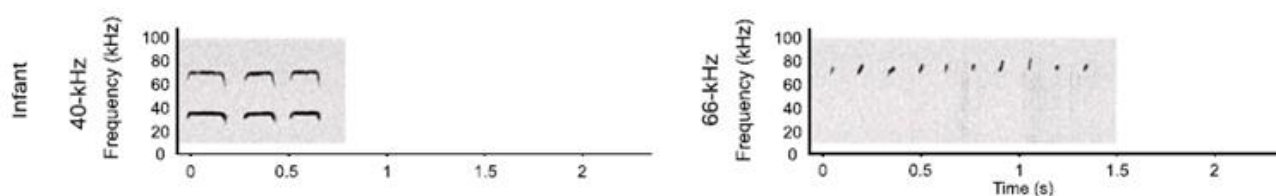


1.10. pav. 50 kHz dažnio vokalizacijų „trill“ kategorijos signalų sonograma. Abscisių ašyje pažymėtas laiko mastelis milisekundėmis (ms), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz) (Wright et al., 2010).

1.3.3. 40 kHz dažnio jauniklių vokalizacijos

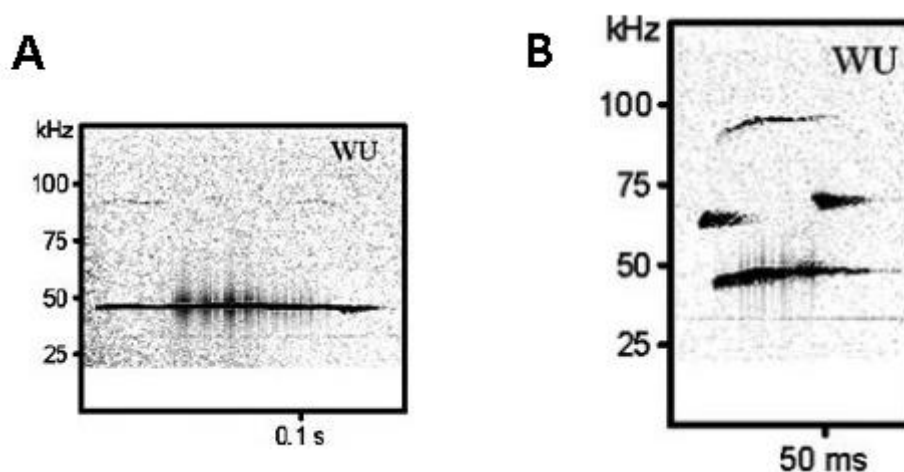
Žiurkių jaunikliai gimsta nepilnai išsivystę: jie kurti, akli, pliki, turi mažai poodinių riebalų, todėl dar negeba kontroliuoti savo kūno temperatūros, jų motorinės funkcijos ribotos (Alberts, 1978). Kadangi jaunikliai yra labai pažeidžiami, jų sėkmingam augimui ir tolimesniam vystymuisi gyvybiškai svarbi motinos priežiūra. Grauzikų jauniklių vokalizacijos yra atsakas į įvairius stimulus bei aplinkos pokyčius: kūno temperatūros pokyčiai, kontaktas su kitais grauzikais, motinos-jauniklio santykiai, prisilietimai, kvapai, jauniklio atskyrimas nuo vados ir motinos (Ehret, 2005). Viena iš gyvybiškai svarbių motinos rūpesčio išraiškų, yra jauniklių anogenitalinės srities laižymas, sutrumpintai AGL (angl. *anogenital licking*). AGL metu žiurkės stimuliuoja nevalingą jauniklių šlapinimąsi ir tuštinimąsi, kas yra labai svarbu jų išgyvenimui. Motinos šiuos veiksmus atlieka, iki kol jaunikliams sukanka 14 dienų (Kauer et al., 2016). Buvo atrastas ryšys tarp AGL ir jauniklių vokalizacijų. Jaunikliai skleisdavo ultragarsinius signalus, kai jautė fiziologinį poreikį šlapintis ar tuštintis, į kuriuos motina reaguodavo ir rūpinosi jaunikliais. Taip pat tyrimo metu, nustatyta, jog tie jaunikliai, kurių motinos neatlikdavo šio veiksmo, žūdavo (Brouette-Lahlou et al., 1992).

Kai kurie autoriai jauniklių vokalizacijas apibūdina kaip sukeltas streso (angl. *distress calls*) (Noirot, 1968) ar sukeltas atskirties (angl. *isolation-induced USV's*) (Shair, 2018). 40 kHz dažnio vokalizacijų akustiniai parametrai apibūdinami labai skirtingai. Boulanger-Bertolus et al., 2017 tyrime, autoriai aprašo 2 jauniklių vokalizacijų tipus: „klasikinis“ 40 kHz dažnio (dažnių pikų diapazonas nuo 35 kHz iki 45 kHz, trukmė apie 200 ms) ir 66 kHz dažnio vokalizacijas. 66 kHz dažnio vokalizacijos nebuvo panašios nei į paauglių, nei į suaugusių žiurkių skleidžiamus signalus, jų trukmė apie 20 ms, o dažnių pikai pasireiškė nuo 60 kHz iki 80 kHz intervale (Boulanger-Bertolus et al., 2017) (1.11. pav.).

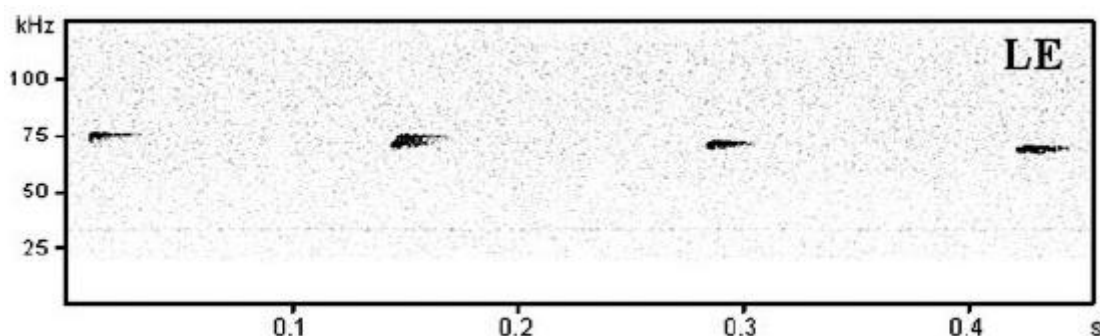


1.11. pav. Žiurkės jauniklių 40 kHz dažnio (kairėje) ir 66 kHz dažnio (dešinėje) vokalizacijų sonogramos. Abscisių ašyje nurodomas laikas sekundėmis (s), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz) (Boulanger-Bertolus et al., 2017).

Kiti autoriai išskiria 3 (Schwarting and Wöhr, 2018) ar net 10 jauniklių vokalizacijų tipų (Brudzynski et al., 1999). Schwarting *et.al.*, 2018 tyrime aprašyti 3 skirtingų žiurkių rūšių jauniklių USV tipai. I-ojo tipo vokalizacijų parametrai atitinka, anksčiau paminėtus „klasikinius“ 40 kHz dažnio signalus (1.12. pav.), II-ojo tipo signalai, taip pat praktiškai atitinka ankstesniame tyrime minėtas 66 kHz dažnio vokalizacijas (1.13. pav.), III-ojo tipo signalai yra trumpi, stipriai moduluojami dažnio (apie 21 kHz), būdingi dažnių pikai – apie 44kHz (1.12. pav.). Dažniausiai pasitaikantys yra I-ojo ir II-ojo tipo signalai (Schwarting and Wöhr, 2018).



1.12. pav. A) *Wistar unilever* (WU) žiurkių jauniklių I-ojo tipo vokalizacijų sonograma. Abscisių ašyje nurodomas laikas sekundėmis (s), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz); B) *Wistar unilever* (WU) žiurkių jauniklių III-ojo tipo vokalizacijų sonograma. Abscisių ašyje nurodomas laikas milisekundėmis (ms), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz) (Schwarting and Wöhr, 2018).



1.13. pav. *Long-Evans* (LE) žiurkių jauniklių II-ojo tipo vokalizacijų sonograma. Abscisių ašyje nurodomas laikas sekundėmis (s), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz) (Schwarting and Wöhr, 2018).

Brudzynski *et.al.*, 1999 straipsnyje aprašomos 10 tipų žiurkės jauniklių vokalizacijos (1.14. pav.). Buvo tirti 10, 15 ir 17 dienų amžiaus jaunikliai. Dažniausiai pasitaikantys visų amžiaus grupių jauniklių vokalizacijų dažniai pateko į diapazoną nuo 40 kHz iki 70 kHz. Atlikto tyrimo metu buvo pastebėta, kad su amžiumi jauniklių vokalizacijų struktūros, dažnių ir trukmės parametrai keičiasi. 17 dienų amžiaus žiurkių jaunikliai dažniau skleidė garsus, kurių struktūra yra panaši į „U“ ar apverstą „U“ raidę (Brudzynski et al., 1999).

No	SONOGRAMS			PICTOGRAM
0				—
1				.
2				\
3				/
4				U
5				∩
6				W
7				W
8				W
9				W

1.14. pav. 10 skirtingų tipų žiurkių jauniklių vokalizacijų sonografiniai pavyzdžiai ir piktogramos. Paveikslo apačioje pavaizduotas mastelis horizontaliai atitinka 50 ms, o vertikalčiai 32 kHz (Brudzynski et al., 1999).

Daugelio tyrimų įrodyta, jog jauniklių vokalizacijų dažnis per laiko vienetą ir kiti anksčiau aprašyti parametrai keičiasi su amžiumi (Branchi et al., 2001; Kromkhun et al., 2013). Vokalizacijų kitimas koreliuoja su jauniklių morfologiniu išsivystymo lygiu. Jaunikiams augant vokalizacijų dažniai mažėja, pavyzdžiui 1 dienos amžiaus jauniklio vokalizacijų dažnio piko vertė nuo 50 kHz nukrito iki 39 kHz jaunikliui būnant 14 dienų amžiaus (Kromkhun et al., 2013). Manoma, jog vokalizacijos reikšmingai pasikeičia, kai jaunikliai pradeda girdėti, atsivėrus ausų kanalams (1 savaitės amžiaus) ir atsimerkia (2 savaičių amžiaus). 40 kHz ir kitų tipų vokalizacijos neaptinkamos jaunikiams pasiekus 21 dienos amžių (Noirot, 1968).

1.3.4. Ultragarsinių vokalizacijų lytiniai skirtumai

Žiurkių ultragarsinių vokalizacijų lytinis dimorfizmas iki šiol yra menkai ištirtas. Vienų autorių teigimu tokie skirtumai egzistuoja skirtinguose kontekstuose, taip pat gali turėti įtakos fiziologiniai patino ir patelės skirtumai. Kitų autorių teigimų skirtumai yra labai nežymūs.

Suaugusios žiurkės skirtingai reaguoja į plėšrūno buvimą netoliese. Patelės skleidžia daugiau 22 kHz dažnio vokalizacijų per ilgesnį laiko tarpą, nei patinai, kurių atsakas į plėšrūno sukeltą grėsmę pasireiškia retais, ilgesnės trukmės signalais, tačiau per ilgesnį laiko tarpą jų bendra trukmė vis tiek mažesnė nei patelių (Blanchard et al., n.d.).

Lytinių santykių metu patelės skleidžia ultragarsinius signalus parodydamos patinui savo norą santykiauti, o savo ruožtu patinas vokalizuoja, kad sustiprintų patelės palankią elgseną jo atžvilgiu (Thomas et al., 1982). Taip pat poravimosi metu abiejų lyčių žiurkės skleidžia trumpus, kompleksiškus 50 kHz dažnio USV. Tačiau, patelių vokalizacijos priklauso nuo vaisingumo ciklo (angl. *estrous cycle*). Žiurkių ciklas vidutiniškai trunka 4 dienas ir yra sudarytas iš 4 fazių: proestrus, estrus, metestrus (ar diestrus I) ir diestrus (arba diestrus II) (Marcondes et al., 2002). Proestrus – paruošiamoji fazė, kurios metu kraujyje pradeda didėti prolaktino, liuteinizuojančio hormono (LH) ir folikulo stimuliuojančio hormono (FSH) lygiai. Estrus fazės metu stipriai padidėja lytinio hormono estrogeno lygiai, dėl to šios fazės metu patelė yra vaisingiausia. Metestrus ir diestrus fazių metu stebimas ryškus hormono progesterono padidėjimas (Marcondes et al., 2002). Patelių estrus fazės metu vokalizacijų dažniai gali siekti net 100 kHz, tai gali būti susiję su šios fazės metu stebimu ypač padidėjusiu lytiniu potraukiu (Thomas and Barfield, 1985). Taip pat tyrimų parodyta, jog patelių 50 kHz dažnio vokalizacijų skleidimas koreliuoja su lytinių hormonų veikla ciklo metu. Teigiamų vokalizacijų kiekis reikšmingai padidėjo žiurkėms tyrimo metu suleidus moteriškų lytinių hormonų - estrogeno ir progesterono (Matochik, 1992).

Žiurkių jauniklių vokalizacijose taip pat aptinkami lytiniai skirtumai. Atskirti nuo motinos patinėliai skleidė žymiai daugiau ir mažesnės amplitudės 40 kHz dažnio streso sukeltų signalų, nei patelės (Bowers et al., 2013).

Tačiau yra ir prieštaringų nuomonių. Lennell *et.al.* 2017 atliko tyrimą, kurio tikslas buvo išsiaiškinti žiurkių USV lytinius skirtumus. Tyrimo rezultatai parodė, kad lytinis dimorfizmas pasireiškia tik trumpos trukmės signaluose. Rastas reikšmingas skirtumas tarp patinų ir patelių

50 kHz vokalizacijų dažnių vidurkių: patelių vokalizacijų dažnių vidurkis 56 ± 5 kHz, o patinų 51 ± 3 kHz (Lenell and Johnson, 2017).

1.4. USV generavimo mechanizmai

22 kHz dažnio ir 50 kHz dažnio vokalizacijos, kaip jau minėta anksčiau, atspindi aversyvią ar pozityvią žiurkių emocinę būseną ir tarnauja kaip vidurūšiniai komunikacijos signalai. Daugelio metų tyrimais įrodyta, jog šios vokalizacijos yra inicijuojamos skirtingų neurocheminių sistemų aktyvumo, o išskiriamos gerklų pagalba.

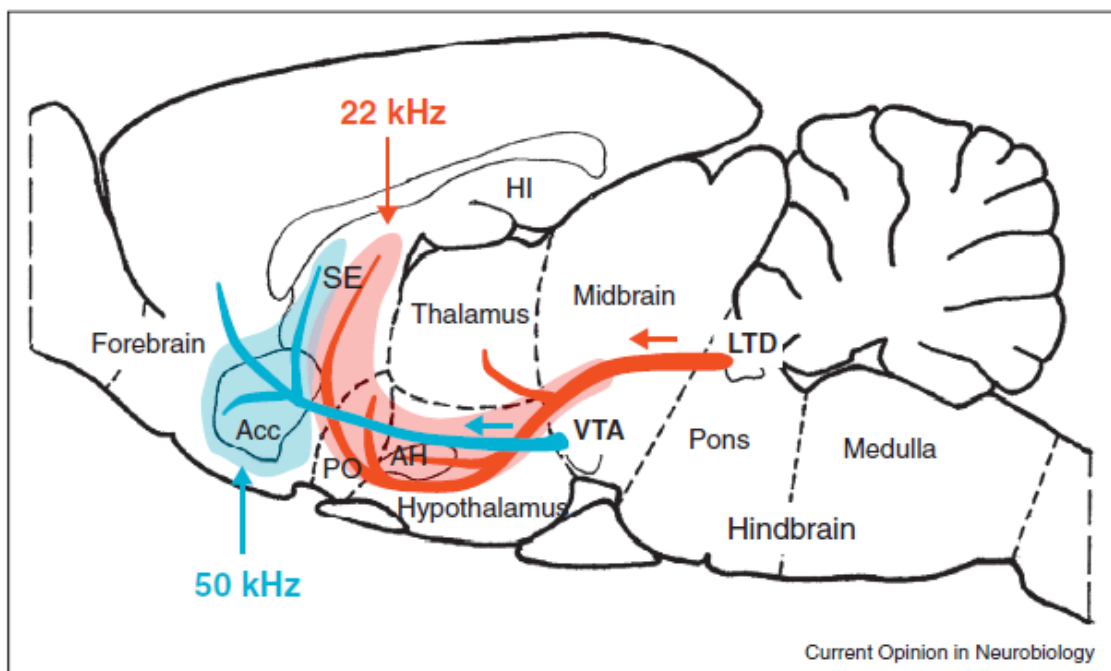
1.4.1. 22 kHz dažnio USV generacija

22 kHz dažnio vokalizacijos inicijuojamos kylančios mezolimbinės cholinerginės sistemos (angl. *ascending mesolimbic cholinergic system*, AMCS) aktyvumo. Sistema yra sudaryta iš cholinerginių neuronų, kurie sudaro galvos smegenų kamieno šoninį nugarinį dangčio branduolį (angl. *laterodorsal tegmental nucleus*, LTD), kuris savo ruožtu turi plačiai paplitusias difuzines kylančias jungtis (Brudzynski, 2014; Miller et al., 1991). Smegenų sritys inervuojamas cholinerginės sistemos aktyvumo vadinamas vidiniu cholinoceptiniu vokalizacijų ruožu (angl. *medial cholinceptive vocalization strip*) (Brudzynski, 2010) (1.15. pav.). Šis ruožas yra AMCS taikiny, jį sudaro priekinė pogumburio sritis, priešreginis laukelis ir šoninė pertvara. LTD cholinerginės projekcijos pasiekusios cholinoceptinį vokalizacijų ruožą, sukelia žiurkių 22 kHz dažnio vokalizacijų emisiją. Taip pat tyrimais įrodyta, kad suleidus nedidelę dozę karbacholio – medžiagos, aktyvuojančios acetilcholino receptorių, į bet kurią „vokalizacijų ruožo“ vietą ar paveikus LTD neuronus sužadinančia aminorūgštimi gliutamatu, yra iššaukiama aversyvi žiurkių būsena lydimą 22 kHz dažnio vokalizacijomis (Brudzynski, 2001; Brudzynski and Barnabi, 1996).

1.4.2. 50 kHz dažnio USV generacija

50 kHz dažnio vokalizacijų emisija sukelia kylančios mezolimbinės dopaminerginės sistemos (angl. *ascending mesolimbic dopaminergic system*, DA). Ją sudaro galvos smegenų pilvinės dangčio sritys (angl. *ventral tegmental area*, VTA) aksonai, kurių projekcijos keliauja

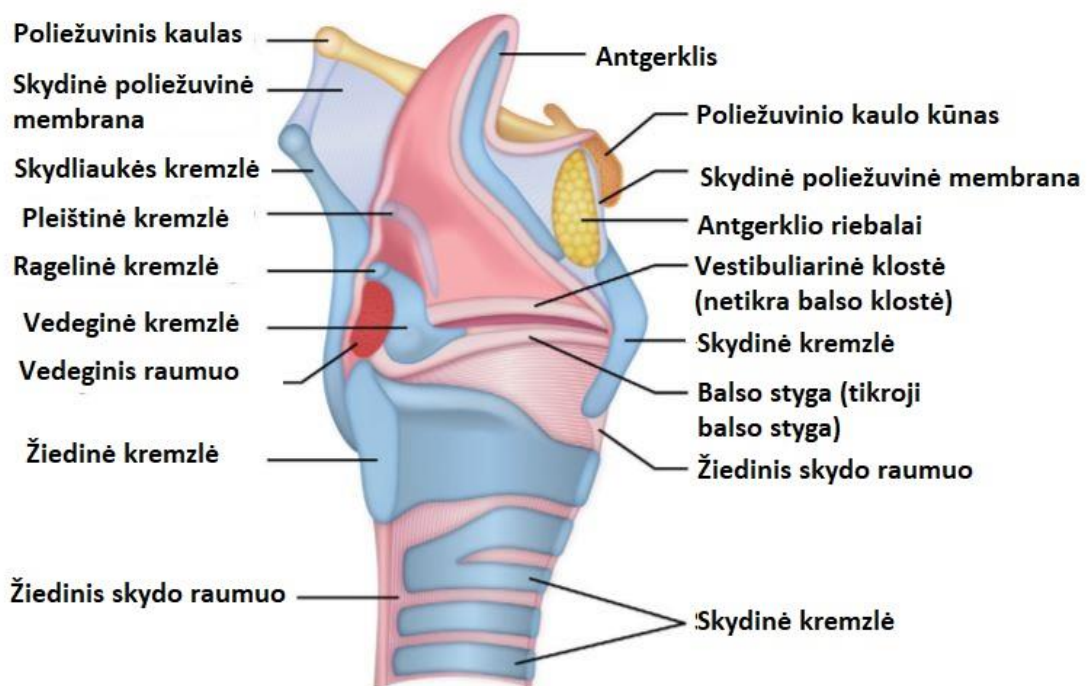
į prigludusį branduolį (angl. *nucleus accumbens*), pertvaros branduolį (angl. *septal nucleus*) ir į žievines sritis (Furtak and Brown, 2018) (1.15. pav.). Manoma, kad dopaminerginiai neuronai iš VTA tiesiogiai prisideda prie dopamino išskyrimo sutelktiniame branduolyje. O išsiskyręs dopaminas sukelia 50 kHz dažnio vokalizacijas (Brudzynski, 2013). Burgdorf et. al., 2007 tyrimas parodė, kad žiurkių galvos smegenų VTA srities stimuliacija elektros impulsais sužadino dopamino išskyrimą, kas lėmė 50 kHz USV „trill“ tipo signalų pasireiškimą. Taip pat buvo atlikti bandymai su amfetamino injekcijomis į sutelktinį branduolį, kas taip pat padidino 50 kHz vokalizacijų emisiją (Burgdorf et al., 2007).



1.15. pav. Parasagitalinis žiurkės galvos smegenų pjūvis (Brudzynski, 2013). Paveiksle pavaizduota supaprastinta AMCS (ryškiai raudona) ir DA sistemos (ryškiai mėlyna) projekcijų schema. Šviesesnė raudona spalva apibrėžia sritis, kurias sužadinus cholinerginiu aktyvumu pasireiškia 22 kHz vokalizacijos („vidinis cholinoceptinis vokalizacijų ruožas“). Šviesesnė mėlyna spalva apibrėžia tas sritis, kurias sužadinus dopaminerginiu aktyvumu pasireiškia 50 kHz dažnio vokalizacijų emisija. Vaizduojamos smegenų dalys ir sritys: Acc – prigludęs branduolys, LTD - nugarinis šoninis nugarinis tilto branduolys, AH – priekinė pogumburio sritis, PO – priešreginis laukelis, SE – šoninė pertvara, VTA – pilvinė dangčio sritis, *medulla* – pailgosios smegenys, *hindbrain* – užpakalinės (rombinės) smegenys, *pons* - tiltas, *midbrain* – vidurinės smegenys, *thalamus* - gumburas, *hypothalamus* - pagumburis, *forebrain* – priekinės smegenys.

1.4.3. Gerklų vaidmuo ultragarsinių vokalizacijų emisijoje

Graužikai skleidžia ultragarsines vokalizacijas naudodami „aerodinaminį švilpimą“. Tai yra unikalus mechanizmas, nerastas kitose gyvūnų rūšyse (Riede et al., 2017). Ultragarsinės vokalizacijos skleidžiamos iškvėpimo metu, kai oro srautas pereina per gerklas, ryklę, nosį ir burną. Gerklos vaidina itin svarbų vaidmenį USV emisijoje (Brown and Riede, 2017, p. 152). Norint geriau suprasti vokalizacijų skleidimo mechanizmą, reikia apžvelgti žiurkių gerklų struktūrą (1.16. pav.).



1.16. pav. Žiurkių gerklų struktūra. Vidurinis išilginės plokštumos vaizdas (Lott, 2015).

Žiurkių gerklos yra sudarytos iš 5 kremzlių: skydliaukės kremzlės, žiedinės kremzlės, porinės vedeginės kremzlės, antgerklis ir ragelinės kremzlės (Inagi et al., 1998). Ragelinė kremzlė vienintelė iš visų anksčiau išvardytų, nerandama žmonių gerklose. Gerkloms būdingi 6 specializuoti raumenys: skydinis poliežuvinis raumuo, žiedinis vedegos raumuo, šoninis ir nugarinis vedegos raumuo, sparnuotas žiedinis raumuo ir priekinis žiedinis raumuo. Pagrindinė raumenų funkcija yra atverti, užverti ir palaikyti balso plyšio, ertmės tarp balso stygų, formą (Kelm-Nelson et al., 2018). Gerklų raumenims būdingas greitas susitraukinėjimas, kuris manoma yra svarbus USV emisijai.

Raumenys inervuojami dviejų pagrindinių galvinio nervo (lot. *nervus cranialis*) atšakų: viršutinio gerklų nervo ir grįžtamojo gerklų nervo. Šių nervų veikla yra kontroliuojama smegenų kamieno esančiame dvejiniam branduolyje (angl. *nucleus ambiguus*). Ypač svarbus skydinis vedegos raumuo, kurio pagalba įtempiamos ir atpalaiduojamos balso stygos. Žiurkių smegenyse skydinio vedegos raumens motoriniai neuronai yra glaudžiai išsidėstę dvejiniam branduolyje kartu su kitais motoriniais neuronais, inervuojančiais kitus gerklų raumenis (Van Daele and Cassell, 2009).

Ultragarsinių signalų produkcija ir emisija yra kompleksiškas procesas. Galvos smegenų kamieno sritys nervų pagalba reguliuoja gerklų raumenis, kurie savo ruožtu susitraukinėdami skatina gerklų susitraukinėjimus. Susitraukinėjant gerkloms balso plyšys atsiveria, dėl iškvepiamo oro susidaro spaudimas. Kvėpavimo metu iškvepiamas oras gerklų sukuriame garsus papildo aerodinamine energija, kuri sukelia balso stygų vibracijas ir yra „aerodinaminio švilpimo“ sukelėja (Kelm-Nelson et al., 2018; Riede, 2018; Riede et al., 2017). Tokiu būdu yra išskiriamos rūšiai būdingos ultragarsinės vokalizacijos.

2. METODIKA

2.1. Tyrimo objektas

Tyrime naudoti *Wistar* linijos žiurkių jaunikliai nuo 0 iki 21 dienos amžiaus. Tyrime pasirinktos naudoti žiurkės, kadangi apie jų fiziologiją bei ultragarsines vokalizacijas žinoma ir prieinama daugiau mokslinės literatūros nei apie peles, kas leido lengviau apsibrėžti tyrimo kryptį. Taip pat, žiurkės ir jų jaunikliai yra didesni už peles ir jų jauniklius, dėl ko su jomis yra lengviau dirbti. Būtent *Wistar* linijos žiurkės pasirinktos dėl jų būdo savybių ir dėl to, jog VU GMC vivariume jos yra plačiai naudojamos. Tyrimas atliktas pagal Valstybinės maisto ir veterinarijos leidimą Nr. G2-20.

Pirmoji tyrimo dalis buvo atliekama nuo 2019.07.19 iki 2019.08.12. Trys suaugusios *Wistar* linijos nėščios žiurkės buvo auginamos VU GMC vivariume. Kiekviena žiurkė buvo patalpinta į atskirą narvą su neribotu priėjimu prie standartinio žiurkių ėdalo ir švaraus vandens. Patalpoje buvo palaikoma vidutinė 21,8°C temperatūra ir 62,4% drėgmė, 12 val. dienos-nakties ciklas nuo 8 val. ryto iki 20 val. vakaro. Žiurkės augintos ant autoklavuotų lapuočių medžių pjuvenų (tiekėjas „UAB Malkinė“).

Pirmoji žiurkė jauniklius atsivedė 2019.07.19 tarp 10 val. ir 14 val., tai yra laikoma pirmąją vada ($n = 11$). Antroji ir trečioji atsivedė jauniklius 2019.07.20 tarp 11 val. ir 14 val. Antrosios vados dydis $n = 13$, trečiosios $n = 15$. Eksperimento atlikimo eigoje dėl ligos iš viso krito 14 jauniklių. Pirmajame eksperimente iš viso naudoti 25 žiurkės jaunikliai.

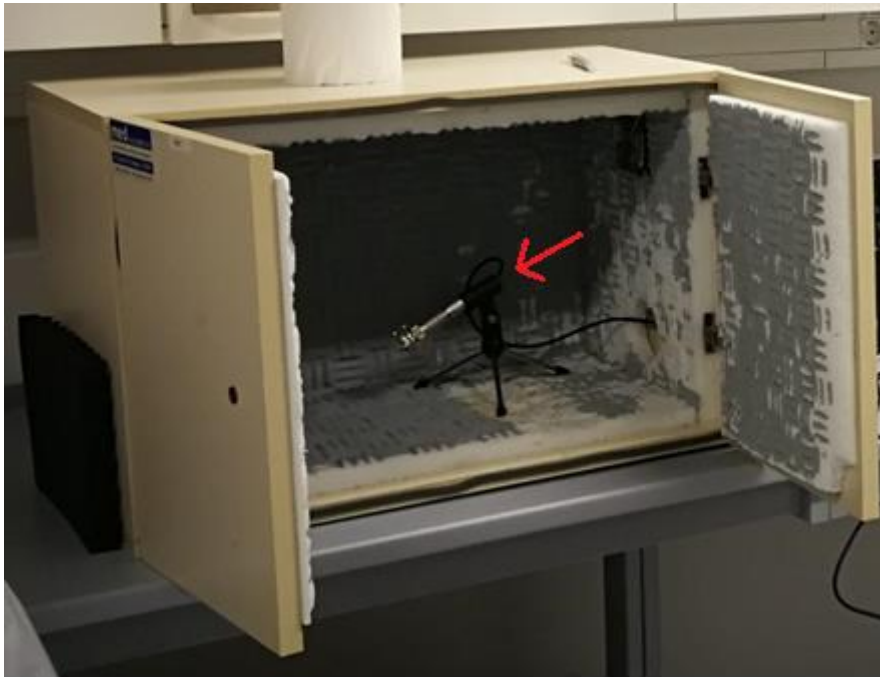
Antroji tyrimo dalis buvo atliekama nuo 2019.12.02 iki 2020.01.18. Šiuo atveju iš VU GMC vivariumo gautos dvi nėščios *Wistar* linijos žiurkės. Abi žiurkės patalpintos viename dideliame narve, turėjo laisvą priėjimą prie standartinio žiurkių pašaro ir švaraus vandens. Kaip ir prieš tai aprašytu atveju, gyvūnai buvo laikomi laboratorinių gyvūnų patalpoje, kur buvo palaikoma pastovi vidutinė 21°C temperatūra ir 62% drėgmė. Naudotos autoklavuotos lapuočių medžių pjuvenos (tiekėjas „UAB Malkinė“).

Prieš gimstant jaunikliams, žiurkės perkeltos ant švarios medicininės vatos. Tiek pirmu, tiek antru atveju žiurkės laikytos ir prižiūrėtos griežtai užtikrinant laboratorinių gyvūnų gerovės reikalavimus.

Antrojo eksperimento pirmoji vada gimė 2019.12.01 apytiksliai iki 12 val. dienos, $n = 10$. Antroji vada gimė 2019.12.13 apytiksliai iki 12 val. dienos, $n = 10$, ne dėl ligos iš viso krito 6 jaunikliai. Pirmoji žiurkė atsivedė dar vieną vadą 2019.12.27 apytiksliai iki 12 val. dienos, $n = 14$. Eksperimente iš viso naudoti 28 *Wistar* linijos žiurkių jaunikliai.

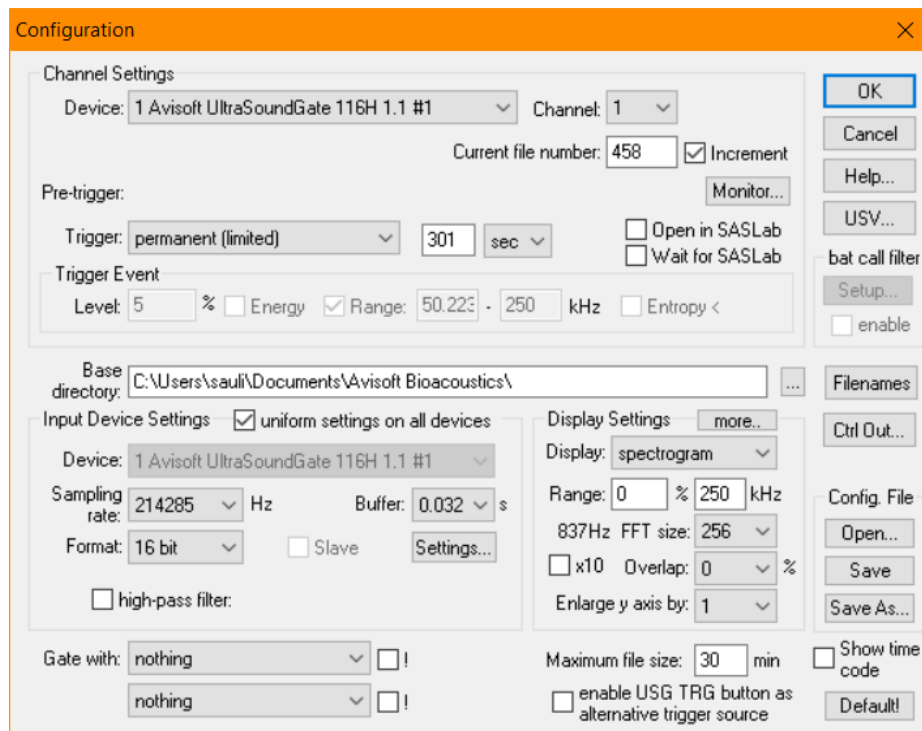
2.2. Tyrimo eiga

Pasiruošimas tyrimui. Išdezinjekuota ir paruošta įrašų atlikimui garso izoliacinė dėžė, kurioje patalpintas „Avisoft bioacoustics“ (Vokietija) ultragarsinis mikrofonas, fiksuojantis garsą nuo 2 kHz iki 250 kHz (2.1. pav.).



2.1. pav. Garsą izoliuojanti dėžė su ant stovo pastatytu ultragarsiniu mikrofonu (pažymėtas raudona rodykle) (autorės nuotrauka).

Mikrofonas ant stovo pastatytas 10 cm iki numatytos jauniklio dėjimo vietos. Pagal instrukciją į asmeninį kompiuterį įdiegta „Avisoft RECORDER USGH“ 4.2.2501 programinės įrangos versija. Šios programos dėka ultragarsinis mikrofonas prijungiamas prie kompiuterio, kuriame išsaugomi visi garso įrašai bei matomas garso įrašymas ir vokalizacijos realiu laiku. Atlikus programinės įrangos instrukcijų apžvalgą, nustatyti parametrai, kurie yra svarbūs įrašo kokybei. Nustatyta įrašomo ultragarso maksimali dažnio reikšmė 214285 Hz, įrašymo laikas 301 sek. (5 min.), įrašo atvaizdavimas spektrograma (2.2. pav.).



2.2. pav. Ultragarsinio mikrofono konfigūracija „Avisoft RECORDER USGH“ programoje. Pakeisti konfigūracijos nustatymai: *permanent (limited) trigger* - nustatyta įrašymo trukmė 301 s (5min) ir automatinis įrašo sustabdymas praėjus šiam laikui, *sampling rate* – maksimalus įrašomo garso dažnis iki 214,282 kHz, *display spectrogram* – įrašyto garso atvaizdavimas spektrograma (autorės nuotrauka).

Pirmojo eksperimento metu ultragarsinės vokalizacijos pradėtos įrašinėti nuo jauniklių gimimo dienos 2019.07.19 ir tęsėsi dvi savaites iki 2019.08.12. Abiejų eksperimentų metodika pritaikyta iš Shahrier *et al.*, 2018 straipsnio. Antrojo eksperimento metodika patobulinta remiantis pirmojo eksperimento patirtimi.

I eksperimento eiga. Kasdien atliekamos procedūros:

1. Jaunikliai atskiriami nuo motinos, ją perkeliant į atskirą narvą.
2. Narvas su jaunikliais pernešamas į laboratoriją, kur vyks USV įrašymas.
3. Kiekvienas jauniklis atsitiktine tvarka išimamas iš lizdo ir dedamas į specialią dėžę su garso izoliacija, kurioje 5 min. įrašinėjamos jo skleidžiamos USV.
4. Pasibaigus įrašymo sesijai jauniklis atsargiai išimamas iš dėžės, pasveriamas, pažymimas ir gražinamas į lizdą.
5. Procesas kartojamas, kol įrašomi, pasveriami ir pažymimi visi vienos vados individai.
6. Narvas su jaunikliais pernešamas atgal į žiurkių laikymo patalpą, kur jaunikliams gražinama motina.

Antrasis eksperimentas pradėtas 2019.12.02, t.y. sekančią dieną po pirmos vados jauniklių gimimo ir tęsėsi iki 2020.01.19. Ultragarsinių vokalizacijų įrašymas truko 21 dieną kiekvienai vada. Šio eksperimento metu, skirtingai nei pirmojo, į garsą izoliuojančią dėžę buvo patalpintas nedidelis permatomas kvadratinis indas į kurį buvo dedama 1,7l talpos „MEDRULL“ guminė šildyklė pripildyta karštu vandeniu. Ant šildyklės buvo dedamas švarios vatos sluoksnis, jog išvengti tiesioginio jauniklio ir guminio šildyklės paviršiaus sąlyčio. Prieš prasidedant eksperimentui, skaitmeniniu termometru su laidiniu davikliu išmatuota 35°C temperatūra žiurkės jauniklių lizde, visiems jaunikliams esant susiglaudus. Indo viduje buvo mėginama kuo tiksliau atkartoti jauniklių lizde išmatuotą temperatūrą. To paties termometro pagalba buvo matuojama į šildyklę pilamo vandens temperatūra, bei visą USV įrašymo laiką matuojama temperatūra inde. Matavimo kameroje pastoviai buvo palaikoma apytiksliai nuo 30°C iki 39°C temperatūra. Temperatūrai nukritus žemiau 30°C į šildyklę buvo pripilama naujo karšto vandens. Tokiu būdu išvengta jauniklių peršalimo ir susirgimų, kurie buvo pasitaikę pirmojo eksperimento metu.

II eksperimento eiga. Kasdien atliekamos procedūros:

1. Jaunikliai kartu su motina narve pernešami iš žiurkių laikymo patalpos į laboratoriją, kurioje vyks USV įrašymas.
2. Jauniklis atsitiktine tvarka išimamas iš lizdo ir dedamas į garsą izoliuojančioje dėžėje patalpintą indą su šildykle ir vatos sluoksniu ant jos, ir įrašinėjamas 5 min.
3. Pasibaigus įrašymui jauniklis atsargiai išimamas iš dėžės, pasveriamas, pažymimas ir gražinamas į narvą pas motina ir kitus jauniklius.
4. Procesas kartojamas, kol įrašomi, pasveriami ir pažymimi visi vados individai.
5. Narvas su žiurke ir jos jaunikliais gražinamas į gyvūnų laikymo patalpą.

Abiejų tyrimų metu jauniklių žymėjimui naudotas netoksiškas, sterilus „TONDAUSTM“ chirurginis odos žymeklis. Kiekvienas jauniklis turėjo savo atskirą žymėjimą (2.3. pav.).

Pradėta žymėti nuo vienos kairios priekinės galūnės. Žymėjimas užkoduotas skaičiais. Pažymėta galūnė protokole žymima 1, o nepažymėta 0. Pavyzdžiui, jei žymimos visos galūnės koduotė būtų 1111, o jei nežymėta nieko - 0000. Jei žymima ir uodega, tai kodo gale pridedama „u“ raidė. Svarbu paminėti, jog atliekant tokio pobūdžio eksperimentus reikia stengtis atlikti viską kiek įmanoma greičiau ir itin atsargiai, jog jaunikliams ir motinai nebūtų sukeltas papildomas stresas.



2.3. pav. Pažymėtas žiurkės jauniklis – pažymėtos abi galinės galūnės ir uodega, kodas 0011u (autorės nuotrauka).

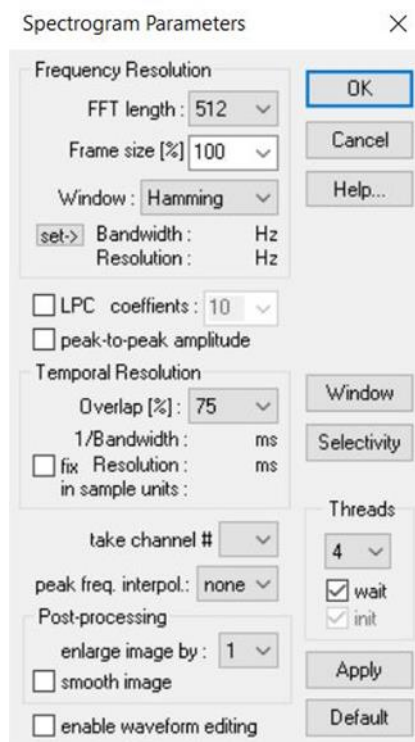
2.3. Duomenų analizė

Duomenų analizė sudaryta iš dviejų etapų: įrašų analizė su programa „Avisoft SASLab pro“ ir statistinė duomenų analizė su programa „RStudio“.

Įrašų analizė. Pirminė įrašų analizė atlikta su „Avisoft SASLab pro“ 5.2.0947 (Vokietija) programos versija. Tai universalus garso analizės, redagavimo ir klasifikacijos įrankis. Šio įrankio pagalba iš vizualių ultragarsinių signalų gauname duomenis skaitine išraiška, kurie vėliau panaudojami statistinei analizei. Atliekant analizę svarbu tinkamai nustatyti spektrogramos parametrus (angl. *spectrogram parameters*) (2.4. pav.) bei automatinių parametrų nustatymo įrankį (angl. *automatic parameter measurement setup*) (2.5. pav.).

Pasirinkti spektrogramos parametrai: *FFT length* 512 – dažnio skiriamoji geba, kuo pasirenkame didesnę skaičių tuo preciziškesnė užfiksuotų dažnių skiriamoji geba, tačiau pasirinkus per didelę reikšmę nukentė laiko skiriamoji geba. Šiuo atveju pasirinktas skaičius yra didesnis už rekomenduojamą 256, bet ir ne toks didelis, jog nukentėtų laikinė geba. Pasirinkta reikšmė taip pat nusako ir spektrogramos aukštį. *Frame size* – rėmelio dydis, ši reikšmė glaudžiai susijusi su dažnio skiriamąja geba. Rėmelio dydį rekomenduojama laikyti 100 proc. dydžio, norint išlaikyti aukštą dažnio skiriamąją gebą. *Window* – analizės langas nulemia nepageidaujamo spektro iškraipymo slopinimą. Šiuo atveju pagal rekomendacijas pasirinktas konkrečiai *Hamming* tipo analizės langas, kuris slopina artimiausią spektro iškraipymą, ko pasekoje analizės lange matomas aiškus vaizdas. *Overlap* – persidengimas tarp dviejų kaimyninių spektro dalių. Šis parametras taip pat nusako ir laikinę skiriamąją gebą.

Persidengimo reikšmė rekomenduojama nustatyti 50% arba 75%. Kiti matomi nustatymai yra numatytieji (angl. *default*).



2.4. pav. Nustatyti spektrogramos parametrai (autorės nuotrauka).

Automatinių parametrų nustatymo įrankyje varnele pažymime tik tuos įrašo parametrus, kurie mums svarbūs atliekamo tyrimo kontekste. Šiame tyrime naudoti parametrai:

- *enable automatic measurements* – pažymėjus varnelę įjungiamas automatinis parametrų nustatymas;
- *compute parameters from entire spectrogram* – įgalina programą apskaičiuoti pasirinktus parametrus visame įraše esantiems signalams;
- *element separation – automatic (whistle tracking)* – pasirinktas automatinis elementų (atskirų vokalizacijų) atskyrimas, pritaikytas graužikų skleidžiamiems signalams; tinkamam elementų atskyrimui pasirinkta minimali vienos vokalizacijos trukmė (*min duration*) 5 ms, minimalus laikas iki kitos vokalizacijos (*hold time*) pasirinktas vizualiai tikrinant elementų atskyrimą, šiuo atveju buvo pasirinktas 20 ms;
- *duration of element* – vienos užfiksuotos vokalizacijos trukmė;
- *break* – tarp atskirų vokalizacijų esantis tylos intervalas, kuris skaičiuojamas nuo vieno elemento pabaigos iki kito elemento pradžios;
- *start/end time* – vieno elemento pradžios ir pabaigos laikas sekundėmis;

- *peak frequency* – maksimali vieno elemento dažnio reikšmė;
- *bandwidth* – skirtumas tarp vieno elemento maksimalaus ir minimalaus dažnio;
- *locations of measurements* – pažymėtų spektrinių parametų apskaičiavimo vieta: *start of element* – elemento pradžia, *end of element* – elemento pabaiga, *min*, *max*, *mean param. of entire element* – minimali, maksimali ir vidutinė vieno elemento pasirinkto parametro reikšmė;
- *uniform parameters for all locations* – kai funkcija aktyvuota, kiekvienai užfiksuotai vokalizacijai, apskaičiuojami visi pasirinkti parametrai (dažnis, trukmė ir kt.) pasirinktose vietose (elemento pradžioje, viduryje ir kt.). Pažymėti parametrai apie kiekvieną įrašę užfiksuotą vokalizaciją pateikiami skaitine išraiška atskirame lange ir gali būti perkelti į „Microsoft excel“ programą, tolimesniam gautų duomenų apdorojimui.

Automatic Parameter Measurements setup

☒ Enable automatic measurements
 ☒ Show graphic results

☒ Compute parameters from entire spectrogram
 ☒ Show numeric results

☒ Automatic update

Element separation ☐ show trace

automatic (whistle tracking)
 max change: 1 pixels = 418 Hz

☐ slope
 min duration: 5 ms
 Hold time: 20 ms

Temporal parameters
☒ Duration of element
 ☐ Date
 ☐ Interval
 ☒ Break
 ☐ Distance from start to max
 ☒ Start/end time
 ☐ absolute

Sub-elements
 ☐ Number of elements
 ☐ Element rate
 Hold time: 5 ms

Waveform parameters
 ☐ rms
 ☒ dB
 ☐ energy
 ☐ peak-to-peak ampl.

Group anal.
 ☐ enable
 100 ms

Spectrum-based parameters
 ☒ Peak frequency
 interpol.: none
 ☐ Peak amplitude
 ☐ Fundamental freq. > 0 Hz
 ☐ ACF
 ☐ Min frequency
 Threshold: -20 dB
 ☐ Max frequency
 ☒ Bandwidth
 ☐ total
 ☐ -10 dB
 ☐ Spectral centroid
 ☐ Entropy
 ☐ Harmonic-to-noise ratio
 average: 10 bins
 ☐ Number of local peaks above: -20 dB
 ☐ Frequencies of local peaks
 ☐ Amplitudes of local peaks
 max peak entries: 5
 Hysteresis for peak detection: 10 dB
 ☒ uniform parameters for all locations

Locations of measurements
☒ Start of element + 0 ms
 ☒ End of element - 0 ms
 ☐ Centre of element
 ☐ Maximum amplitude of element
 ☐ Mean
 ☐ Max spectrum of entire element
 ☒ Min param. of entire element
 ☐ t
 ☒ Max param. of entire element
 ☐ t
 ☒ Mean param. of entire element
 ☐ Relative stddev of entire element
 ☐ Regular intervals of 100 ms
 max entries: 20
 ☐ Regular intervals of duration/ 4
 ☐ Reject if peak ampl. < -50 dB
 ☒ exclude rejected elements from results
 Derived parameters:

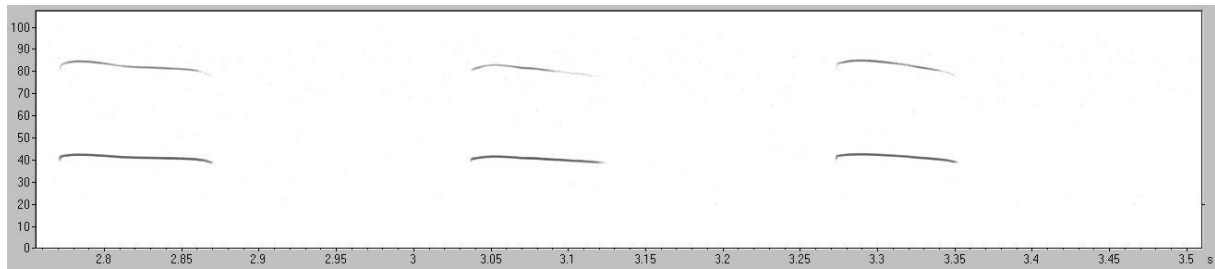
Post filter on elements
 ☐ enable
 min duration: 100 ms
 max entropy: 0.3
 ☐ add filename
 ☐ each row
 ☒ with path
 Presets

 Classification
 ☒ enable

2.5. Naudoti automatiniai parametrai (autorės nuotrauka)

30

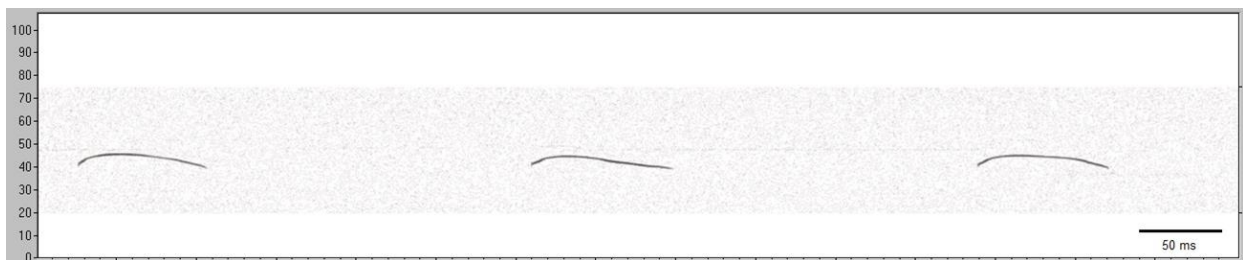
Analizuojant įrašus pasitaikė neaiškumų. Vienas tokių - „dvigubos vokalizacijos“ (2.6. pav.), kurios nebuvo aprašytos jokiose literatūriniuose šaltiniuose.



2.6. pav. 4 dienų amžiaus jauniklio vokalizacijų harmonika. Abscisių ašyje nurodomas laikas sekundėmis (s), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz) (autorės nuotrauka).

Pasikonsultavus su specialistais išsiaiškinta, jog susidūrėme su akustikoje dažnu reiškiniu, vadinamu harmonika (nuo angl. *harmonics*) arba obertonas (angl. *overtone*). Tai reikškins, kai žemiausio dažnio garsas, vadinamas pagrindiniu dažniu (angl. *fundamental frequency*), yra atkartojamas dvigubai aukštesnio dažnio garsu. Abu terminai iš principo reiškia tą patį, tačiau reikėtų patikslinti, jog jei kalbame apie harmoniką galioja anksčiau aprašytas paaiškinimas, jei kalbame apie obertoną turime omenyje visus aukštesnio dažnio garsus, išskyrus pagrindinį žemiausio dažnio garą (Moravcsik and Rosenbluth, 2002, p. 115). Harmonikos reikšmė žiurkių skleidžiamuose signaluose nėra aiški, o antrojo aukštesnio dažnio garsai šioje analizėje yra ignoruojami.

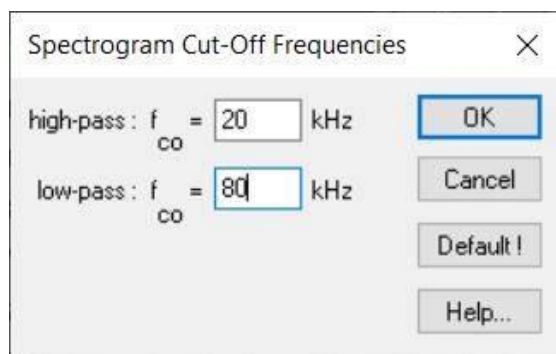
Analizė atliekama įkėlus pasirinktą garso įrašą į programą ir sukūrus spektrogramą. Atsidariusiame lange matome įrašytas ultragarsines vokalizacijas (2.7. pav.).



2.7. pav. 1 dienos amžiaus jauniklio ultragarsinės vokalizacijos. Abscisių ašyje nurodomas laiko mastelis 50 milisekundžių (ms), ordinačių ašyje garso dažnis kilohercais (kHz) (autorės nuotrauka).

Vizualiai peržiūrime visą įrašą ir įvertiname ties kokia viršutine ir apatine dažnio riba galime nukirpti įrašą. Jei turime obertonų atvejį, reikia nukirpti aukštesnio dažnio vokalizacijas,

kadangi jos iškreipia skaitine išraiška gaunamus duomenis. Tam naudojame „Cut-off frequencies“ įrankį (2.8. pav.). *High-pass* – aukšto dažnio filtras, praleidžiantis signalus esančius virš nustatytos ribos, buvo nustatyta 20 kHz riba; *low-pass* – žemo dažnio filtras, praleidžiami signalai esantys iki pasirinktos aukšto dažnio ribos, nustatymai svyravo nuo 60 kHz iki 100 kHz dažnio ribos.



2.8. pav. Dažnių režijų nustatymo įrankis. *High-pass* – aukšto dažnio filtras, *low-pass* – žemo dažnio filtras (autorės nuotrauka).

Norint išvengti duomenų praradimo (pavienių aukšto dažnio USV), gali tekti naudoti „trintuko“ įrankį (angl. *eraser tool*), kurio pagalba iš įrašo ištrinami obertonai, jei nėra galimybės juos pašalinti brėžiant dažnių ribas. Toliau naudojame anksčiau aprašyta automatinių parametrų nustatymo įrankį, kurio dėka visos vokalizacijos yra automatiškai pažymimos, o atskirame lange gauname jų skaitinę išraišką.

Statistinė analizė. Antroje analizės dalyje visi skaičiavimai atlikti su programa „Rstudio“ 1.2.1335 versija. Tai programa skirta statistinių duomenų apdorojimui ir jų analizei.

Duomenys surinkti „xlsx“ formatu, todėl jų peržiūrai naudota „readxl()“ funkcija iš paketo „tidyverse“. Duomenų sutvarkymui naudoti paketai: „janitor“ – greitam duomenų pavadinimų sutvarkymui, „fs“ – darbui su duomenų aplankais ir „ggpubr“ – paketas, skirtas grafikų braižymui.

Visi duomenys sujungiami į vieną lentelę, kuri pertvarkoma taip, kad kiekvienas individas būtų priskirtas atitinkamai vadai, o kiekvienam individui pagal dieną nuo 1 iki 21 dienos būtų priskirti tiriami parametrai: dienos vokalizacijų skaičius, vidutinė dienos vokalizacijų trukmė, vidutinis dienos vokalizacijų dažnis ir vidutinis dienos dažnių juostos plotis. Taip pat, individai išskirti pagal lytį.

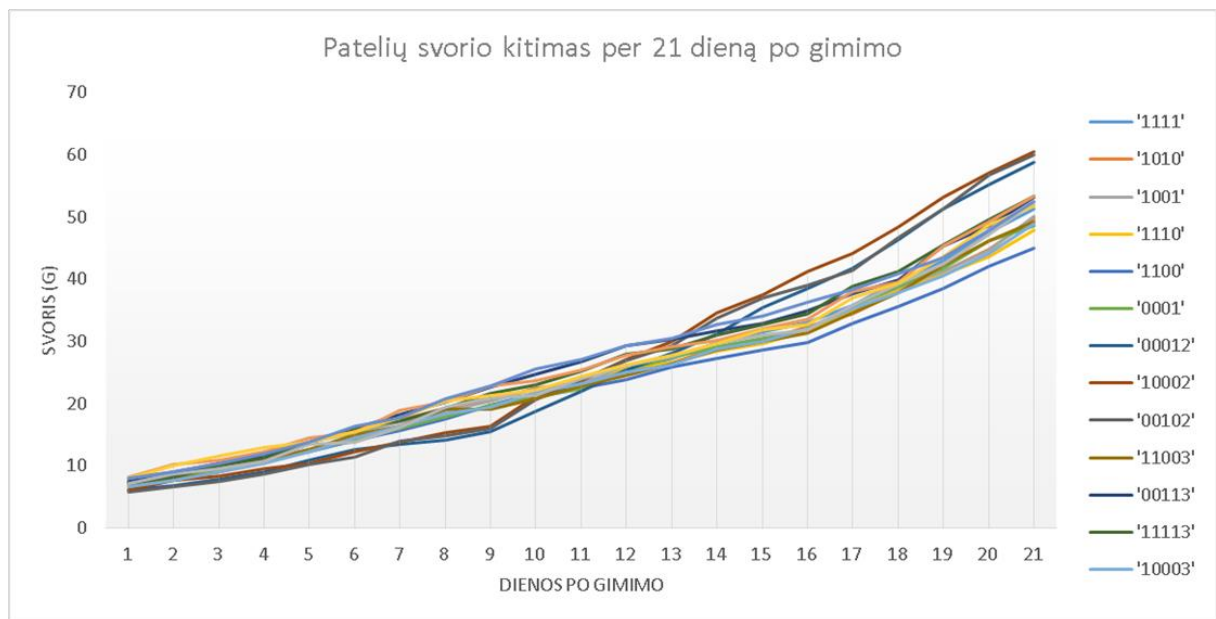
Duomenų skirstinio normalumo prielaidai patikrinti taikyti grafinis metodas ir statistinis kriterijus. Grafinis metodas – brėžiama kvantilių palyginimo (QQ) diagrama su „qqnorm()“ funkcija, o taikytas statistinis Shapiro-Wilk kriterijus apskaičiuojamas su „shapiro_test()“ funkcija iš paketo „rstatix“. Duomenų normalumas tikrinamas kiekvienam parametrai atskirai grupuojant pagal lytį ir dieną, tam naudojama „group_by()“ funkcija iš „dplyr“ paketo.. Kiekvienam tiriamam parametrai atskirai brėžiami lyginamieji grafikai, tam naudojamas „ggplot()“ paketas. Tiriamų parametrų lytinių skirtumų priklausomybė nuo dienos po gimimo palyginimui taikytas neparametrinis nepriklausomų imčių Mann-Whitney-Wilcoxon kriterijus, kuris gaunamas naudojant „wilcox_test“ funkciją iš „rstatix“ paketo.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

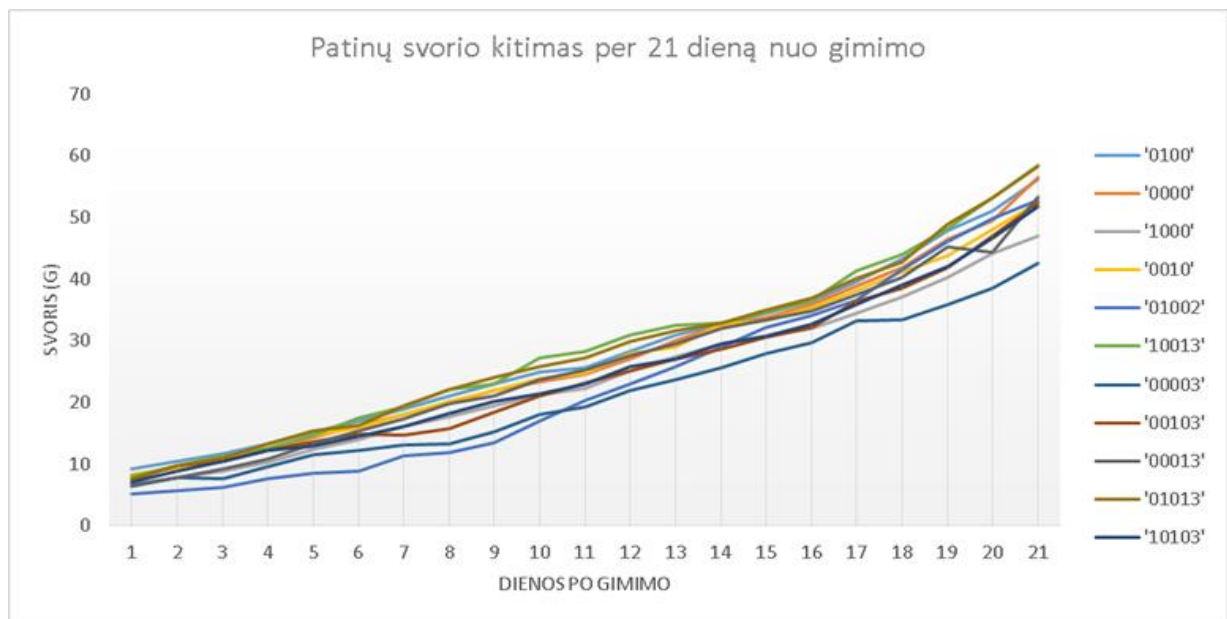
Duomenų analizėje naudoti tik II eksperimento metu surinkti duomenys, kadangi I eksperimento metu surinkti duomenys negali būti traktuojami kaip patikimi, dėl jauniklių ligos.

3.1. Jauniklių svorių prieaugis

Viso II eksperimento metu, jaunikliai kasdien buvo sveriami. Iš (3.1. pav) ir (3.2. pav) matyti, jog tiek patelių, tiek patinų svoris augo tolygiai nuo 1 iki 21 dienos po gimimo. Tolygus svorio augimas parodo normalią jauniklių fizinę sveikatą.



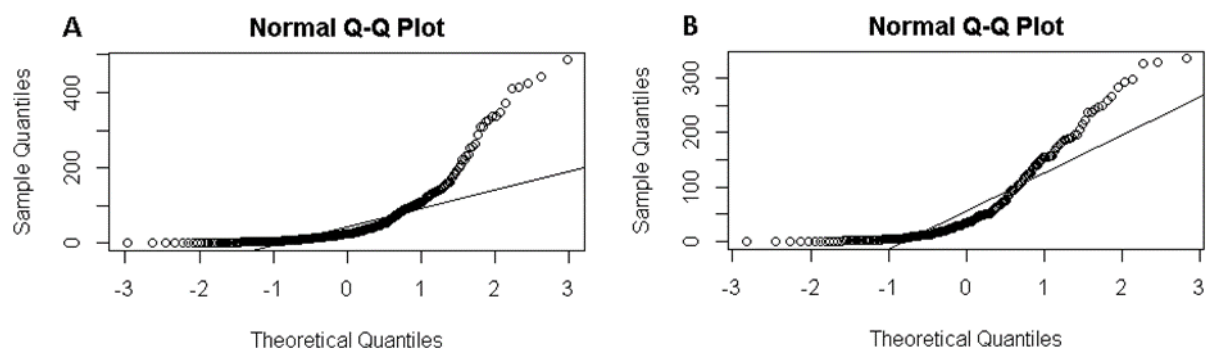
3.1. pav. Patelių svorių augimas nuo 1 iki 21 dienos po gimimo. Abscisių ašyje nurodomas dienos skaičius, ordinačių ašyje svoris (g), legendoje spalvomis pažymėti atskiri individai.



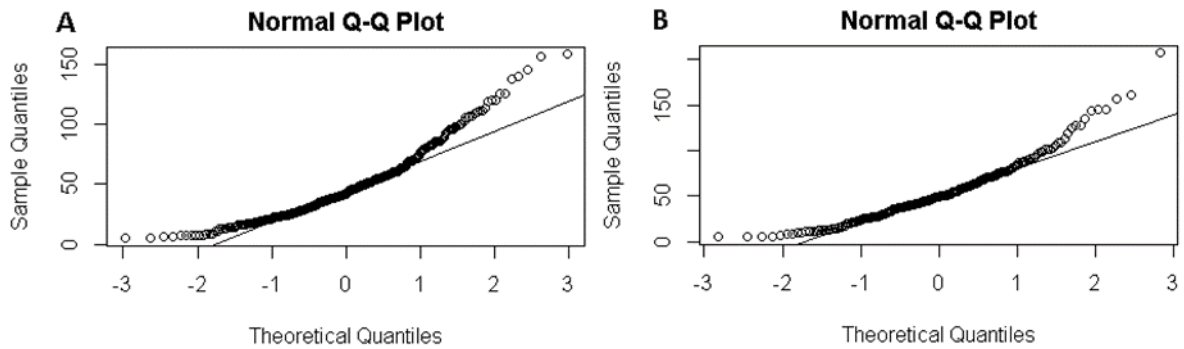
3.2. pav. Patinų svorių augimas nuo 1 iki 21 dienos po gimimo. Abscisių ašyje nurodomas dienos skaičius, ordinačių ašyje svoris (g), legendoje spalvomis pažymėti atskiri individai.

3.2. Duomenų skirstinio normalumo prielaidos tikrinimas

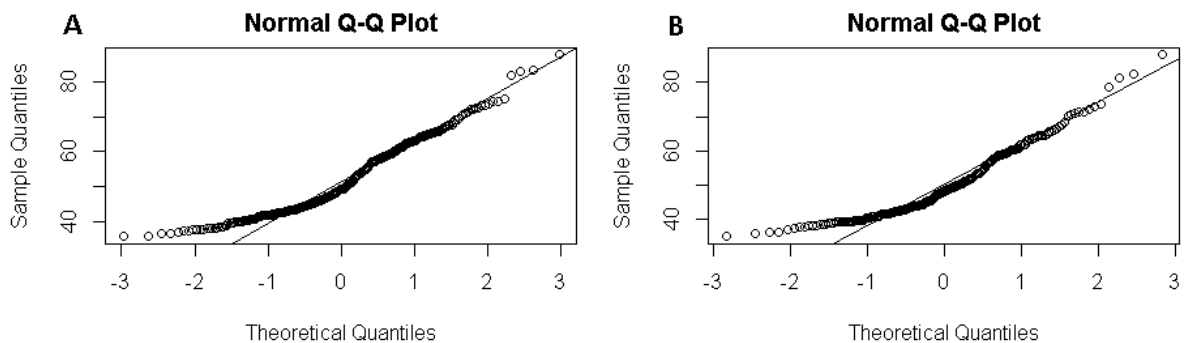
Duomenų normalumo prielaida kiekvienam tiriamam parametrui atskirai tikrinta grafiniu metodu braižant kvantilių palyginimo (QQ) diagramą pagal lytį (3.3. – 3.6. pav). Taip pat, taikytas Shapiro-Wilk statistinis kriterijus grupuojant duomenis pagal lytį ir dieną. Gauta kiekvienos dienos reikšmė $p < 0,05$, tai reiškia, kad duomenų pasiskirstymo nuokrypis nuo normaliojo yra statistiškai reikšmingas ir normalumo prielaida yra pažeista. Abiem atvejais nustatyta, jog duomenys nėra normalieji, todėl tolimesnėje analizėje taikomas neparametrinis analizės metodas.



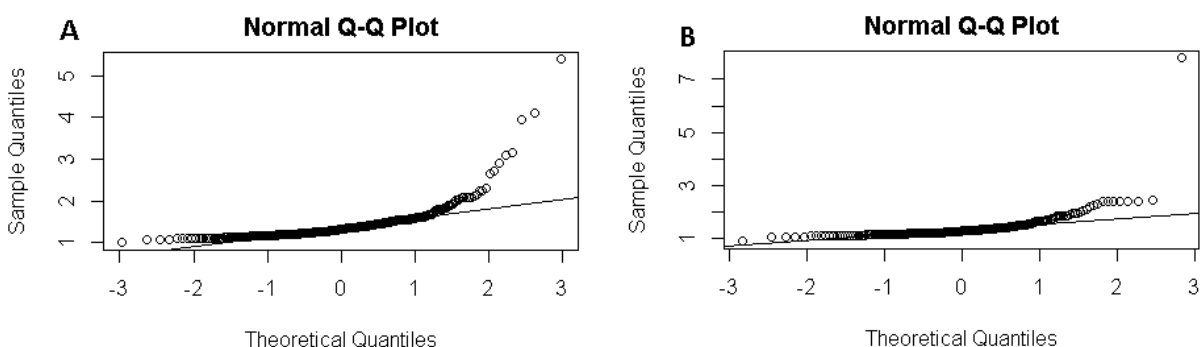
3.3. pav. Patelių (A) ir patinų (B) vokalizacijų skaičiaus kvantilių palyginimo (QQ) diagramos. Matome, jog duomenų pasiskirstymas nėra normalus, kadangi reikšmių taškai nėra išsidėstę vienoje tiesėje, ryškios išskirtys. Abscisių ašyje nurodomi teoriniai kvantiliai, ordinačių ašyje iš duomenų apskaičiuoti kvantiliai.



3.4. pav. Patelių (A) ir patinų (B) vokalizacijų vidutinės trukmės kvantilių palyginimo (QQ) diagramos. Matome, jog duomenų pasiskirstymas nėra normalus, kadangi reikšmių taškai nėra išsidėstę vienoje tiesėje, ryškios išskirtys. Abscisių ašyje nurodomi teoriniai kvantiliai, ordinačių ašyje iš duomenų apskaičiuoti kvantiliai.



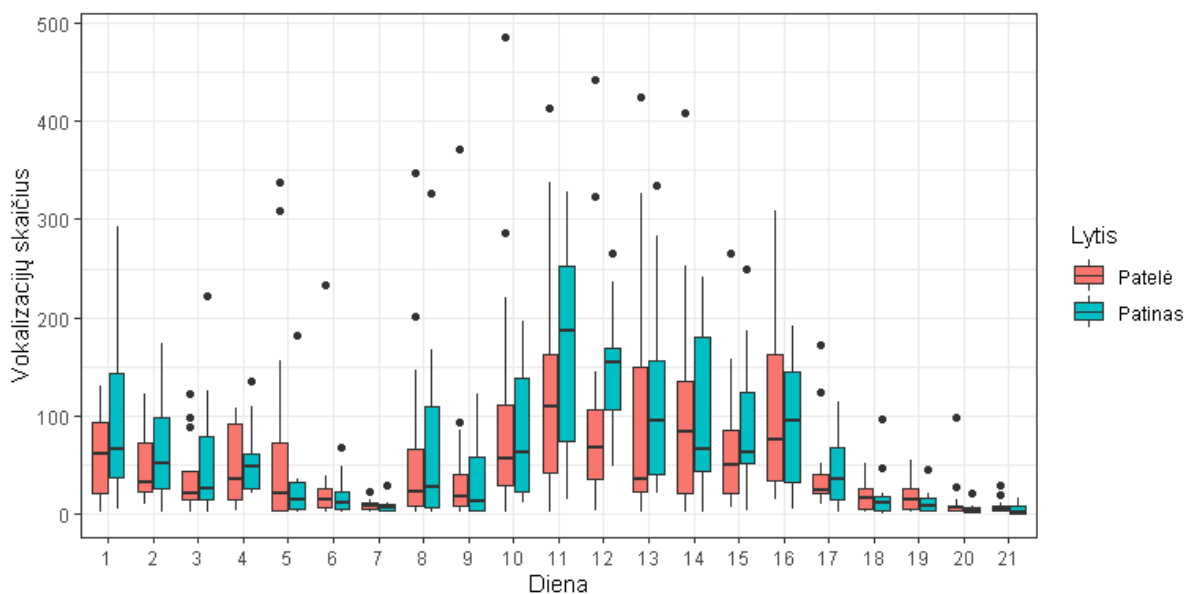
3.5. Patelių (A) ir patinų (B) vokalizacijų vidutinių dažnių kvantilių palyginimo (QQ) diagramos. Matome, jog duomenų pasiskirstymas nėra normalus, kadangi reikšmių taškai nėra išsidėstę vienoje tiesėje, ryškios išskirtys. Abscisių ašyje nurodomi teoriniai kvantiliai, ordinačių ašyje iš duomenų apskaičiuoti kvantiliai.



3.6. pav. Patelių (A) ir patinų (B) vokalizacijų vidutinių dažnių juostos pločių kvantilių palyginimo (QQ) diagramos. Matome, jog duomenų pasiskirstymas nėra normalus, kadangi reikšmių taškai nėra išsidėstę vienoje tiesėje, ryškios išskirtys. Abscisių ašyje nurodomi teoriniai kvantiliai, ordinačių ašyje iš duomenų apskaičiuoti kvantiliai.

3.3. Vokalizacijų skaičius

Vokalizacijų skaičiaus priklausomybės nuo dienos ir lyties grafikas (3.7. pav.) taip pat parodo, jog duomenys nėra normalieji, kadangi yra daug išskirčių. Grafike stebimas ryškus vokalizacijų skaičiaus mažėjimas nuo 1 iki 7 dienos po gimimo. Tai susiję su jauniklių ausų kanalų išsivystymu 7 dieną po gimimo. Nuo 7 dienos matome staigų vokalizacijų skaičiaus didėjimą, kuris pasiekia piką 11 dieną, nuo 12 iki 16 dienų išlieka stabilus, o nuo 17 dienos iki 21 dienos stebimas staigus skleidžiamų signalų skaičiaus sumažėjimas. Lyginant lytis grafike matome, jog dažniausiai daugiausia ultragarsinių vokalizacijų skleidžia patinai. Literatūrinių šaltinių duomenimis žiurkių jauniklių skleidžiamų ultragarsinių vokalizacijų skaičius koreliuoja su jų morfologinio išsivystymo lygiu: iki 7 dienos nėra stebima ryški jauniklių reakcija į atskyrimą nuo motinos, 7 dieną po gimimo jaunikliai pradeda girdėti ir nuo tada vokalizacijų kiekis didėja, kadangi jiems dar reikalingas motinos rūpestis. Apie 14 dieną po gimimo jaunikliai atsimerkia ir vis dar yra maitinami motinos, todėl skleidžiamų signalų kiekis drastiškai nekinta, tačiau vokalizacijų kiekis pradeda mažėti, kai jaunikliai pradeda maitintis savarankiškai apytiksliai nuo 15 – 16 dienos po gimimo (Branchi et al., 2001; Kromkhun et al., 2013; Noirot, 1968; Shahrier and Wada, 2018).



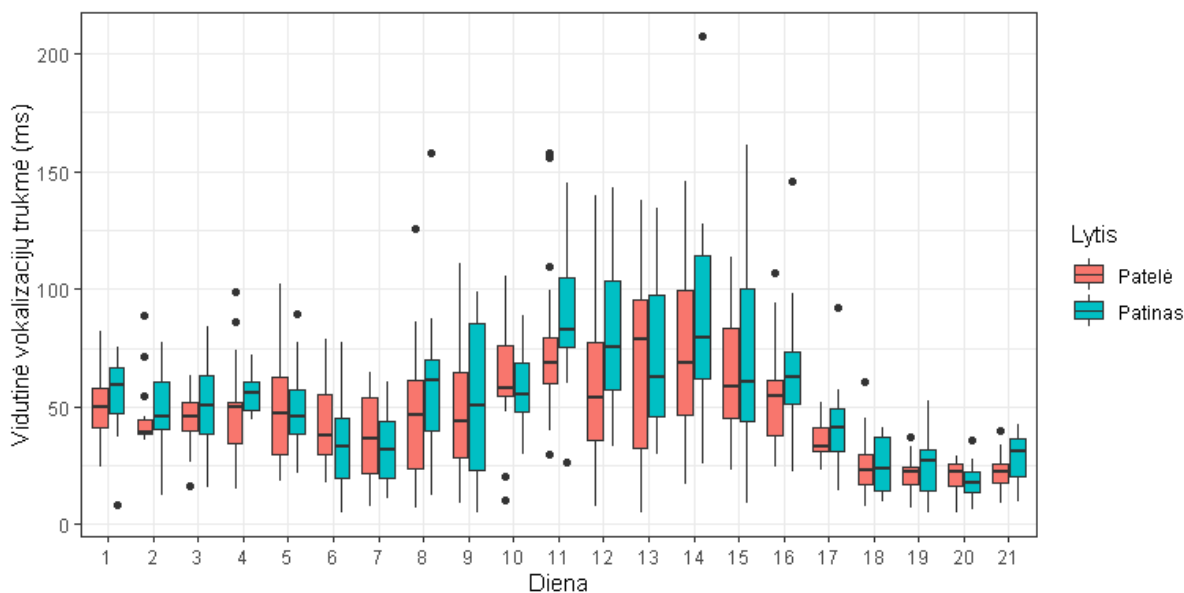
3.7. pav. Jauniklių ultragarsinių vokalizacijų skaičiaus kitimas per 21 dieną po gimimo ir skirtumai tarp lyčių. Abscisių ašyje nurodomas dienos po gimimo skaičius, ordinačių ašyje vokalizacijų skaičius. Grafike dėžutė vaizduoja Q1 ir Q3 duomenų kvartilius, duomenų centras – mediana, „ūsus“ galai vaizduoja minimalias ir maksimalias reikšmes, o juodi taškai – duomenų išskirtis.

Lygintas patelių ir patinų vokalizacijų skaičius priklausomai nuo dienos po gimimo. Skirtumas tarp patelių (mediana = 67,0 , Q1 = 36,0 , Q3 = 106,0 , MAD = 57,8, n = 17) ir patinų

(mediana = 155,0 , Q1 = 106,0 , Q3 = 168,0 , MAD = 34,1, n = 11) vokalizacijų skaičiaus 12 dieną po gimimo buvo statistiškai reikšmingas (Mann-Whitney-Wilcoxon kriterijus, dvipusė alternatyva, $W = 48$, $p = 0,034$, $r_w = 0,40$, n = 28). Kitomis dienomis reikšmingų skirtumų nerasta.

3.4. Vidutinė vokalizacijų trukmė

Vidutinės vokalizacijų trukmės priklausomybės nuo dienos ir lyties grafikas (3.8. pav.) taip pat parodo, jog duomenys nėra normalieji, kadangi yra daug išskirčių. Grafike stebimas nežymus vokalizacijų vidutinės trukmės mažėjimas nuo 1 iki 7 dienos po gimimo, tai taip pat gali būti susiję su jauniklių ausų kanalų išsivystymu 7 dieną po gimimo. Nuo 8 dienos matome ryškų vidutinės vokalizacijų trukmės didėjimą, kuris pasiekia piką maždaug 14 dieną, tuo metu jaunikliai atsimerkia. Nuo 16 iki 20 dienos vokalizacijų vidutinė trukmė mažėja ir 21 dieną vėl nežymiai padidėja. Lyginant lytis grafike matome, jog dažniausiai ilgiausia vidutinė vokalizacijų trukmė būdinga patinams. Šiame grafike taip pat, kaip ir vokalizacijų skaičiaus grafike, stebima parametro mažėjimo tendencija iki 7 dienos po gimimo, nuo 8 pradeda kilti, o nuo 16 dienos pradeda leistis. Remiantis literatūra galima daryti prielaidą, jog žiurkių jauniklių vidutinė vokalizacijų trukmė taip pat priklauso nuo jauniklio išsivystymo lygio (Branchi et al., 2001; Kromkhun et al., 2013; Noirot, 1968; Shahrier and Wada, 2018)

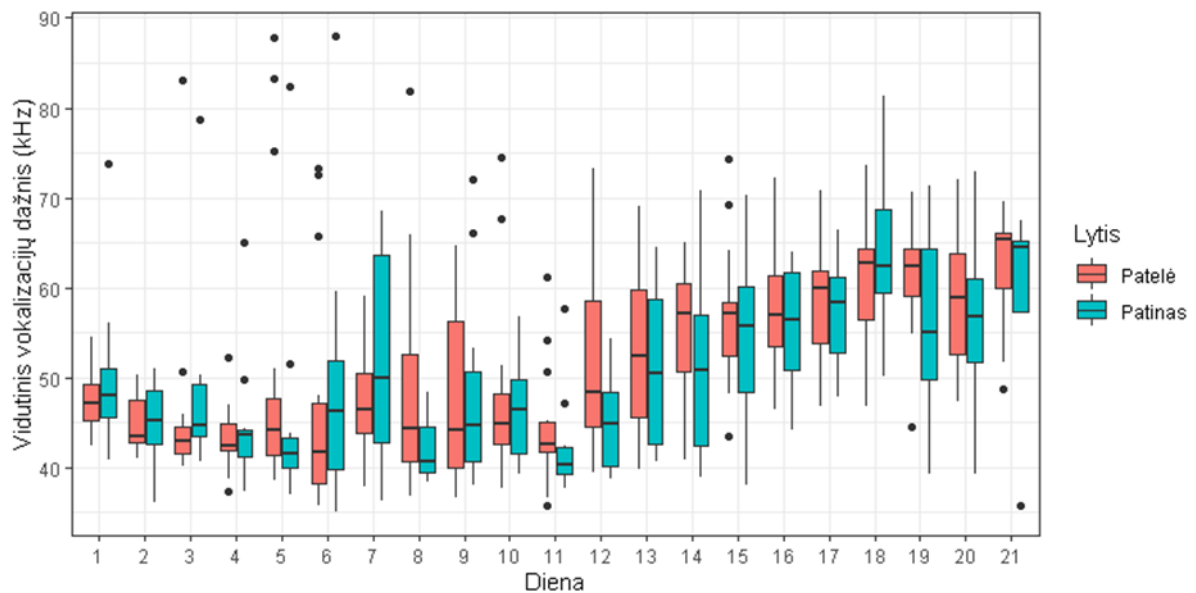


3.8. pav. Jauniklių ultragarsinių vokalizacijų vidutinės trukmės kitimas per 21 dieną po gimimo ir skirtumai tarp lyčių. Abscisių ašyje nurodomas dienos po gimimo skaičius, ordinačių ašyje vidutinė vokalizacijų trukmė milisekundėmis (ms). Grafike dėžutė vaizduoja Q1 ir Q3 duomenų kvartilius, duomenų centras – mediana, „ūsus“ galai vaizduoja minimalias ir maksimalias reikšmes, o juodi taškai – duomenų išskirtis.

Lyginta patelių ir patinų vidutinė vokalizacijų trukmė priklausomai nuo dienos po gimimo. Skirtumas tarp patelių (mediana = 53,9 , Q1 = 35,6 , Q3 = 77,4 , MAD = 34,9 , n = 17) ir patinų (mediana = 75,4 , Q1 = 57,1 , Q3 = 103,6 , MAD = 35,8 , n = 11) vidutinės vokalizacijų trukmės 12 dieną po gimimo buvo statistiškai nereikšmingas, tačiau gautas vidutinis efekto dydis (Mann-Whitney-Wilcoxon kriterijus, dvipusė alternatyva, $W = 54$, $p = 0,066$, $r_w = 0,35$, n = 28). Efekto dydis nusako sąsają tarp kintamųjų, šiuo atveju tarp patinų ir patelių vidutinių vokalizacijų trukmių 12 dieną po gimimo. Kitomis dienomis reikšmingų skirtumų nerasta.

3.5. Vidutiniai vokalizacijų dažniai

Vidutinių vokalizacijų dažnių priklausomybės nuo dienos ir lyties grafikas (3.9. pav.) taip pat parodo, jog duomenys nėra normalieji, kadangi yra daug išskirčių. Grafike stebimas nežymus vokalizacijų vidutinių dažnių mažėjimas nuo 1 iki 4 dienos po gimimo. Nuo 5 dienos vidutinių dažnių reikšmės pradeda didėti, o 11 dieną matomas ryškus vidutinių dažnių sumažėjimas. Nuo 12 iki 21 dienos stebimas vidutinių vokalizacijų dažnių didėjimas, pasiekiantis piką 18 dieną. Grafike taip pat matosi, kad nuo pat 1 iki 10 ir 15 dienomis po gimimo jauniklių vokalizacijoms būdingi aukšti vidutiniai dažniai viršijantys 70 kHz ribą. Vizualiai lygindami lytinius skirtumus, grafike matome, jog vidutinių vokalizacijų dažnių diapazonai tarp lyčių beveik nesiskiria, tik stebimi ryškiausi skirtumai 7 dieną, kai patinų vidutinių dažnių diapazonas buvo ryškiai didesnis bei viršijo 60 kHz ribą, patelių vidutinių dažnių diapazonas šiek tiek virš 50 kHz dažnių ribos. Vidutinių vokalizacijų dažnių didėjimas taip pat koreliuoja su amžiumi ir morfologiniu jauniklio išsivystimo lygiu (Noirot, 1968).



3.9. pav. Jauniklių ultragarsinių vokalizacijų vidutinių dažnių kitimas per 21 dieną po gimimo ir skirtumai tarp lyčių. Abscisių ašyje nurodomas dienos po gimimo skaičius, ordinačių ašyje vidutiniai vokalizacijų dažniai kilohercais (kHz). Grafike dėžutė vaizduoja Q1 ir Q3 duomenų kvartilius, duomenų centras – mediana, „ūsu“ galai vaizduoja minimalias ir maksimalias reikšmes, o juodi taškai – duomenų išskirtis.

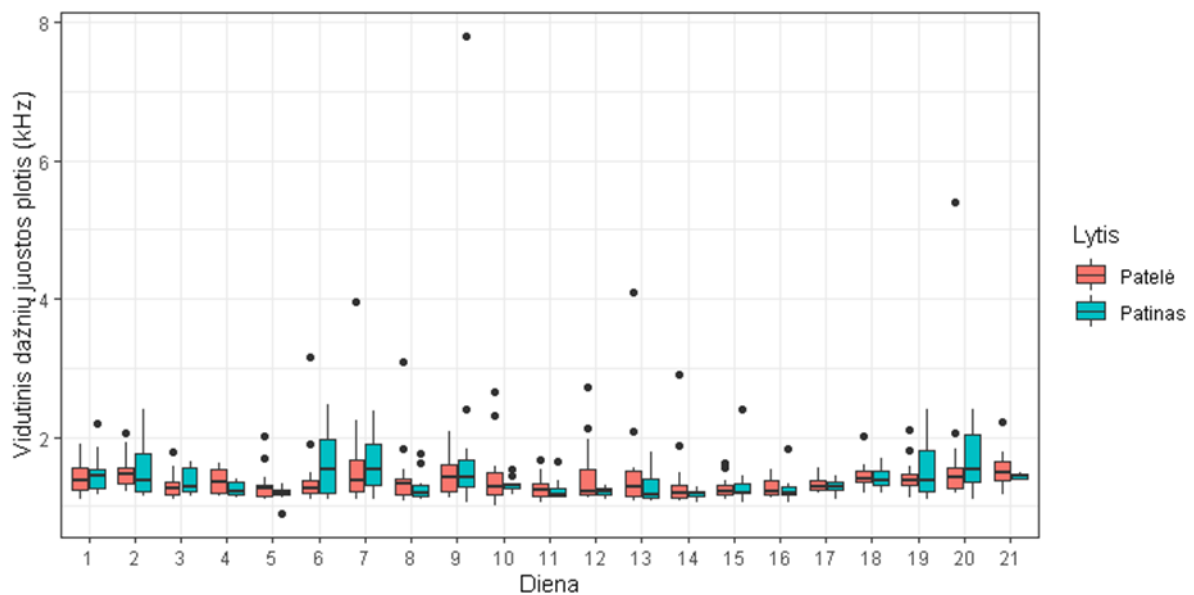
Lyginta patelių ir patinų vidutinių vokalizacijų dažnių priklausomybė nuo dienos po gimimo. Skirtumas tarp patelių (mediana = 43,0 , Q1 = 41,6 , Q3 = 44,6 , MAD = 2,3 , n = 17) ir patinų (mediana = 44,7 , Q1 = 43,6 , Q3 = 49,3 , MAD = 3,8 , n = 10) vidutinių vokalizacijų dažnių 3 dieną po gimimo buvo statistiškai nereikšmingas, tačiau gautas vidutinis efekto dydis (Mann-Whitney-Wilcoxon kriterijus, dvipusė alternatyva, $W = 49$, $p = 0,074$, $r_w = 0,35$, n = 27).

Skirtumas tarp patelių (mediana = 48,4 , Q1 = 44,6 , Q3 = 58,5 , MAD = 8,7 , n = 17) ir patinų (mediana = 44,9 , Q1 = 40,2 , Q3 = 48,3 , MAD = 6,6 , n = 11) vidutinių vokalizacijų dažnių 12 dieną po gimimo buvo statistiškai nereikšmingas, tačiau gautas vidutinis efekto dydis (Mann-Whitney-Wilcoxon kriterijus, dvipusė alternatyva, $W = 128$, $p = 0,111$, $r_w = 0,31$, n = 28).

Efekto dydis nusako sąsają tarp kintamųjų, šiuo atveju tarp patinų ir patelių vidutinių vokalizacijų dažnių 3 ir 12 dieną po gimimo. Kitomis dienomis reikšmingų skirtumų nerasta.

3.6. Vidutinis dažnių juostos plotis

Vidutinių vokalizacijų dažnių juostos pločių priklausomybės nuo dienos ir lyties grafikas (3.10. pav.) taip pat parodo, jog duomenys nėra normalieji, kadangi yra išskirčių. Grafikas parodo, jog jaunikių ultragarsinių vokalizacijų vidutiniai dažnių juostos pločiai visą periodą nuo 1 iki 21 dienos po gimimo išlieka beveik vienodi (1-2 kHz), tai reiškia, kad jaunikių ultragarsinėse vokalizacijose dominuoja plokšti signalai ir retais atvejais dažniu moduluojami. Išskyrus 6 - 7 dienas ir 19 - 20 dienas, kai patinėlių vokalizacijų dažnių juostos reikšmės smarkiai pasidėja.



3.10. pav. Jaunikių ultragarsinių vokalizacijų vidutinių dažnių juostos pločių kitimas per 21 dieną po gimimo ir skirtumai tarp lyčių. Abscisių ašyje nurodomas dienos po gimimo skaičius, ordinačių ašyje vidutiniai vokalizacijų dažniai juostų pločiai kilohercais (kHz). Grafike dėžutė vaizduoja Q1 ir Q3 duomenų kvartilius, duomenų centras – mediana, „ūsus“ galai vaizduoja minimalias ir maksimalias reikšmes, o juodi taškai – duomenų išskirtis.

Lyginta patelių ir patinų vokalizacijų vidutinių dažnių juostos pločių priklausomybė nuo dienos po gimimo Mann-Whitney-Wilcoxon kriterijumi. Statistiškai reikšmingų skirtumų nerasta.

IŠVADOS

1. Ištirus žiurkių jauniklių ultragarsinių vokalizacijų parametrų kitimą nuo 1 iki 21 dienos po gimimo nustatyta, jog jauniklio ultragarsinių vokalizacijų skaičius, vidutinė vokalizacijų trukmė, vidutinis vokalizacijų dažnis bei vidutinė vokalizacijų dažnių juosta kinta priklausomai nuo jauniklio morfologinio išsivystymo lygio:
 - Stebimas parametrų reikšmių mažėjimas iki 7 dienos po gimimo, kai jaunikliams išsivysto ausų kanalai ir jie pradeda girdėti.
 - Nuo 7 dienos stebimas parametrų reikšmių didėjimas iki 14 dienos, kai jaunikliai atsimerkia; 14 - 16 dienomis parametrų reikšmės išlieka stabilios.
 - Nuo 16 iki 21 dienos po gimimo vokalizacijų skaičius ir trukmė pradeda stipriai mažėti, nes jaunikliai nebereikalauja motinos rūpesčio, tačiau didėja vidutinio dažnio ir dažnių juostos parametrų reikšmės, kadangi jauniklių vokalizacijos tampa suaugėlių vokalizacijomis.
2. Ištirus ultragarsinių vokalizacijų parametrų reikšmių skirtumus tarp lyčių statistiškai reikšmingų skirtumų nerasta, išskyrus 12 dieną po gimimo patelių ir patinų vokalizacijų skaičius reikšmingai skyrėsi – patinai vokalizavo žymiai daugiau nei patelės.

REKOMENDACIJOS

1. Atliekant tyrimus su žiurkių jaunikliais ir atskiriant jos nuo motinos ilgesniam laikui būtina atskirtiems jaunikliams užtikrinti atitinkamą temperatūrinį režimą, kadangi šaltis jaunikliams sukelia ligą ir mirtį.
2. Norint sumažinti suaugėlės žiurkės stresą, dirbant su jos jaunikliais, rekomenduojama medžio pjuvenas pakeisti sterilia medicinine vata. Naudojant vatą, žiurkėms sukuriama žaismingesnė aplinka, jos gali vatą išsidėlioti kaip pačios nori, pasidaryti iš jos guolį, kuriame slepiasi, kas nėra įmanoma su medžio pjuvenomis. Taip pat, rekomenduojama dėl higienos sąlygų užtikrinimo vatą keisti kasdien.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Brigita Danilovaitė

Bakalauro baigiamasis darbas

**LABORATORINIŲ ŽIURKIŲ (*WISTAR*) JAUNIKLIŲ
ULTRAGARSINIŲ VOKALIZACIJŲ TYRIMAS**

SANTRAUKA

Geriausiai ištirtos suaugusių žiurkių ultragarsinės vokalizacijos, tačiau jauniklių skleidžiami signalai ne mažiau svarbūs. Dažniausiai tiriami pavienių dienų žiurkių jauniklių ultragarsinių signalų parametrai, tačiau nėra nuoseklaus tyrimo atlikto nuo 1 iki 21 dienos po gimimo, iki kol jaunikliai tampa suaugėliais.

Šio bakalauro darbo tikslas - ištirti *Wistar* linijos žiurkių jauniklių ultragarsines vokalizacijas (USV) nuo 1 iki 21 dienos po gimimo. Darbo uždaviniai: ištirti ultragarsinių vokalizacijų parametrų reikšmių (USV skaičiaus, vidutinės vokalizacijų trukmės, vidutinio vokalizacijų dažnio, vidutinės vokalizacijų dažnių juostos) kitimą per 21 dieną nuo gimimo bei ištirti jauniklių USV parametrų skirtumus tarp lyčių.

Žiurkių jauniklių ultragarsinės vokalizacijos tirtos atlikus 28 individų (17 patelių ir 11 patinų) skleidžiamų USV įrašymą kiekvieną dieną nuo 1 iki 21 dienos po gimimo. Jauniklių USV įrašymas vykdytas VU GMC vivariume nuo 2019.12.02 iki 2020.01.19. Gauti duomenys analizuoti su „Avisoft SASLab pro“ 5.2.0947 (Vokietija) programos versija ir statistinės analizės programa „Rstudio“ 1.2.1335 versija.

Tyrimo metu nustatyta, kad žiurkių jauniklių ultragarsinių vokalizacijų skaičius, vidutinė vokalizacijų trukmė, vidutinis vokalizacijų dažnis bei vidutinė vokalizacijų dažnių juosta kinta priklausomai nuo jauniklių morfologinio išsivystymo lygio. Ištyrus ultragarsinių vokalizacijų parametrų reikšmių skirtumus tarp lyčių statistiškai reikšmingų skirtumų nerasta, išskyrus 12 dieną po gimimo, kai patinų vokalizacijų skaičius buvo reikšmingai didesnis, nei patelių.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Brigita Danilovaitė

Bachelor thesis

ULTRASONIC VOCALIZATION ANALYSIS OF LABORATORY RAT (WISTAR) PUPS

SUMMARY

Ultrasonic vocalizations (USVs) of adult rats are best studied, but the signals emitted by the offspring are no less important. The most common parameters of ultrasound signals for rat pups are studied on an individual day, but there is no consistent study conducted from 1 to 21 days after birth until the rat pups become adults.

The purpose of this bachelor's thesis is to study the USVs of the rat pups of the Wistar line from 1 to 21 days after birth. Work tasks: to investigate changes in the values of ultrasonic vocalization parameters (USV number, mean vocalization frequency, average vocalization frequency, average vocalization bandwidth) within 21 days of birth, and to investigate gender differences in rat pups USV parameters.

Ultrasonic vocalizations of rat pups were investigated by recording USVs emitted by 28 individuals (17 females and 11 males) every day from 1 to 21 days after birth. The recording of rat pups USVs was carried out in the Vilnius University Life sciences center vivarium from 02.12.2019 to 19.01.2020. The resulting data were analyzed with Avisoft SASLab pro 5.2.0947 (Germany) program version and statistical analysis program Rstudio version 1.2.1335.

The study showed that the number of USVs in rat pups, the mean duration of vocalizations, the mean frequency of vocalizations, and the mean frequency bandwidth of vocalizations vary according to the morphological level of development of the offspring. No statistically significant differences were observed in the differences in the values of the parameters of USVs between the sexes, except on day 12 after birth, when the number of male vocalizations was significantly higher than in females.

PADĖKOS

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui prof. dr. Osvaldui Rukšėnui už supratingumą, vertingas įžvalgas ir pagalbą.

VU GMC vivariumo specialistei Emilijai Baltrukonytei už pagalbą, patarimus bei pamokymus, darbo su žiurkėmis klausimais.

Taip pat, nuoširdžiai dėkoju lekt. Vilmantui Gėgžnai už kantrybę, supratingumą ir visas konsultacijas statistinės analizės klausimais.

LITERATŪRA

3. Ahrens, A., Ma, S., Maier, E., Duvauchelle, C., Schallert, T., 2009. Repeated intravenous amphetamine exposure: Rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. *Behav. Brain Res.* 197, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.037>
4. Alberti, P.W., 2006. THE ANATOMY AND PHYSIOLOGY OF THE EAR AND HEARING. *Occup. Expo. Noise Eval. Prev. Control* 11.
5. Alberts, J.R., 1978. Huddling by rat pups: Group behavioral mechanisms of temperature regulation and energy conservation. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92, 231–245. <https://doi.org/10.1037/h0077459>
6. Au, W.W.L., Fay, R.R., Popper, A.N. (Eds.), 2000. *Hearing by Whales and Dolphins*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1150-1>
7. Barfield, R.J., Auerbach, P., Geyer, L.A., McIntosh, T.K., 1979. Ultrasonic Vocalizations in Rat Sexual Behavior. *Am. Zool.* 19, 469–480.
8. Barker, D.J., 2018. Ultrasonic Vocalizations as an Index of Positive Emotional State, in: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 253–260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00024-X>
9. Blanchard, R.J., Agullana, R., McGee, L., Weiss, S., n.d. Sex Differences in the Incidence and Sonographic Characteristics of Antipredator Ultrasonic Cries in the Laboratory Rat 8.
10. Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Agullana, R., Weiss, S.M., 1991. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol. Behav.* 50, 967–972. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90423-L](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90423-L)
11. Blanchard, R.J., Yudko, E.B., Blanchard, D.C., Taukulis, H.K., 1993. High-frequency (35–70 kHz) ultrasonic vocalizations in rats confronted with anesthetized conspecifics: Effects of gepirone, ethanol, and diazepam. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 313–319. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90467-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90467-8)
12. Bolles, R.C., 1970. Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol. Rev.* 77, 32–48. <https://doi.org/10.1037/h0028589>
13. Boulanger-Bertolus, J., Rincón-Cortés, M., Sullivan, R.M., Mouly, A.-M., 2017. Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13518-6>
14. Bowers, J.M., Perez-Pouchoulen, M., Edwards, N.S., McCarthy, M.M., 2013. Foxp2 Mediates Sex Differences in Ultrasonic Vocalization by Rat Pups and Directs Order of Maternal Retrieval. *J. Neurosci.* 33, 3276–3283. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0425-12.2013>
15. Branchi, I., Santucci, D., Alleva, E., 2001. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav. Brain Res.* 125, 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00277-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00277-7)
16. Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., Vigouroux, M., 1992. Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. *Behav. Brain Res.* 50, 147–154. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80296-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80296-7)
17. Brown, C., Riede, T., 2017. *Comparative Bioacoustics: An Overview*. Bentham Science Publishers.

18. Brudzynski, S.M., 2019. Emission of 22 kHz vocalizations in rats as an evolutionary equivalent of human crying: Relationship to depression. *Behav. Brain Res.* 363, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.033>
19. Brudzynski, S.M., 2018. *Handbook of Ultrasonic Vocalization: A Window into the Emotional Brain*. Academic Press.
20. Brudzynski, S.M., 2017. Communication of Emotions in Animals☆, in: *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.00289-3>
21. Brudzynski, S.M., 2014. The Ascending Mesolimbic Cholinergic System—A Specific Division of the Reticular Activating System Involved in the Initiation of Negative Emotional States. *J. Mol. Neurosci.* 53, 436–445. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0179-1>
22. Brudzynski, S.M., 2013. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.014>
23. Brudzynski, S.M., 2010. Medial cholinceptive vocalization strip in the cat and rat brains: initiation of defensive vocalizations, in: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 265–279. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374593-4.00026-7>
24. Brudzynski, S. M., 2009. Communication of Adult Rats by Ultrasonic Vocalization: Biological, Sociobiological, and Neuroscience Approaches. *ILAR J.* 50, 43–50. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.1.43>
25. Brudzynski, Stefan M., 2009. *Handbook of Mammalian Vocalization: An Integrative Neuroscience Approach*. Academic Press.
26. Brudzynski, S.M., 2005. Principles of Rat Communication: Quantitative Parameters of Ultrasonic Calls in Rats. *Behav. Genet.* 35, 85–92. <https://doi.org/10.1007/s10519-004-0858-3>
27. Brudzynski, S.M., 2001. Pharmacological and behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 611–617. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00058-6)
28. Brudzynski, S.M., Barnabi, F., 1996. Contribution of the ascending cholinergic pathways in the production of ultrasonic vocalization in the rat. *Behav. Brain Res.* 80, 145–152. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00029-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00029-0)
29. Brudzynski, S.M., Bihari, F., Ociepa, D., Fu, X.-W., 1993. Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: Long and short calls. *Physiol. Behav.* 54, 215–221. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90102-L](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90102-L)
30. Brudzynski, S.M., Kehoe, P., Callahan, M., 1999. Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Dev. Psychobiol.* 34, 195–204. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199904\)34:3<195::AID-DEV4>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199904)34:3<195::AID-DEV4>3.0.CO;2-S)
31. Burgdorf, J., Kroes, R.A., Moskal, J.R., 2017. Rough-and-tumble play induces resilience to stress in rats: *NeuroReport* 28, 1122–1126. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000864>
32. Burgdorf, J., Wood, P.L., Kroes, R.A., Moskal, J.R., Panksepp, J., 2007. Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav. Brain Res.* 182, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.010>

33. Butrimienė J. et al., 2003. Fizika biomedicinos ir fizinių mokslų studentams I dalis. Vilniaus universiteto leidykla, Vilnius.
34. Commins, S., 2018. Behavioural Neuroscience, 1st ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316221655>
35. Dorey, N., 2019. Zoo animal learning and training, First edition. ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
36. Ehret, G., 2005. Infant Rodent Ultrasounds ? A Gate to the Understanding of Sound Communication. Behav. Genet. 35, 19–29. <https://doi.org/10.1007/s10519-004-0853-8>
37. Ekman, P., 2006. Darwin and Facial Expression: A Century of Research in Review. ISHK.
38. Evers, L.G., Haak, H.W., 2010. The Characteristics of Infrasound, its Propagation and Some Early History, in: Le Pichon, A., Blanc, E., Hauchecorne, A. (Eds.), Infrasound Monitoring for Atmospheric Studies. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9508-5_1
39. Furtak, S.C., Brown, T.H., 2018. Limbic-System Involvement in Rat Ultrasonic Communications, in: Handbook of Behavioral Neuroscience. Elsevier, pp. 95–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00009-3>
40. Gelfand, S.A., 2017. Hearing: An Introduction to Psychological and Physiological Acoustics, Sixth Edition, 6th Edition. ed. CRC Press; 6 edition.
41. Horowitz, A.C., Bekoff, M., 2007. Naturalizing Anthropomorphism: Behavioral Prompts to Our Humanizing of Animals. Anthrozoös 20, 23–35. <https://doi.org/10.2752/089279307780216650>
42. Huggenberger, S., Rauschmann, M.A., Vogl, T.J., Oelschläger, H.H.A., 2009. Functional Morphology of the Nasal Complex in the Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena* L.). Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol. 292, 902–920. <https://doi.org/10.1002/ar.20854>
43. Inagi, K., Schultz, E., Ford, C.N., 1998. An Anatomic Study of the Rat Larynx: Establishing the Rat Model for Neuromuscular Function. Otolaryngol. Neck Surg. 118, 74–81. [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(98\)70378-X](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(98)70378-X)
44. Kairys, A., Liniauskaitė, A., 2014. GYVŪNŲ ASMENYBĖ IR BRUOŽŲ TEORIJA. Psichologija 49, 7–19. <https://doi.org/10.15388/Psichol.2014.49.3697>
45. Kauer, S.D., Allmond, J.T., Belnap, S.C., Brumley, M.R., 2016. Maternal behavior influences development of a reflexive action pattern in the newborn rat. Dev. Psychobiol. 58, 1043–1054. <https://doi.org/10.1002/dev.21438>
46. Kelm-Nelson, C.A., Lenell, C., Johnson, A.M., Ciucci, M.R., 2018. Laryngeal Activity for Production of Ultrasonic Vocalizations in Rats, in: Handbook of Behavioral Neuroscience. Elsevier, pp. 37–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00004-4>
47. Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. Neurosci. Biobehav. Rev. 23, 925–935. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
48. Kromkhun, P., Katou, M., Hashimoto, H., Terada, M., Moon, C., Saito, T.R., 2013. Quantitative and qualitative analysis of rat pup ultrasonic vocalization sounds induced by a hypothermic stimulus. Lab. Anim. Res. 29, 77. <https://doi.org/10.5625/lar.2013.29.2.77>

49. Lenell, C., Johnson, A.M., 2017. Sexual dimorphism in laryngeal muscle fibers and ultrasonic vocalizations in the adult rat: Sexual Dimorphism of the Adult Rat Larynx. *The Laryngoscope* 127, E270–E276. <https://doi.org/10.1002/lary.26561>
50. Lott, D.G., 2015. Tissue Engineering of Larynx, in: *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier, pp. 625–640. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00051-5>
51. Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A.P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62, 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
52. Marulanda, J.L., 2018. Acoustic Communication and Social Behavior in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). Université Paris-Saclay.
53. Matochik, J., 1992. Regulation of sociosexual communication in female Long-Evans rats by ovarian hormones. *Horm. Behav.* 26, 545–555. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(92\)90021-M](https://doi.org/10.1016/0018-506X(92)90021-M)
54. Miller, J.W., Bardgett, M.E., Gray, B.C., 1991. The role of the laterodorsal tegmental nucleus of the rat in experimental seizures. *Neuroscience* 43, 41–49. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90415-K](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90415-K)
55. Møller, A.R., 2006. Hearing: anatomy, physiology, and disorders of the auditory system, 2nd Edition. ed. Academic Press, Amsterdam ; Boston.
56. Moravcsik, M.J., Rosenbluth, D., 2002. Musical sound: an introduction to the physics of music. Kluwer Acad./Plenum, New York, NY.
57. Moss, C.F., 2018. Auditory Mechanisms of Echolocation in Bats. *Oxf. Res. Encycl. Neurosci.* <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.102>
58. Mulvihill, K.G., Brudzynski, S.M., 2018. Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: Social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. *Physiol. Behav.* 196, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.09.005>
59. Naguib, M., 2006. Animal Communication: Overview. *Encycl. Lang. Linguist.* 9. <https://doi.org/10.1016/B0-08-044854-2/00804-X>
60. Noirot, E., 1968. Ultrasounds in young rodents. II. Changes with age in albino rats. *Anim. Behav.* 16, 129–134. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(68\)90123-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(68)90123-1)
61. Pellis, S.M., Burke, C.J., Kisko, T.M., Euston, D.R., 2018. 50-kHz Vocalizations, Play and the Development of Social Competence, in: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 117–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00011-1>
62. Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M., 2009. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd Edition. ed. Academic Press.
63. Poel, A.M. van der, Miczek, K.A., 1991. Long Ultrasonic Calls in Male Rats following Mating, Defeat and Aversive Stimulation: Frequency Modulation and Bout Structure. *Behaviour* 119, 127–142.
64. Portfors, C.V., 2007. Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rats and Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46, 7.
65. Riede, T., 2018. Peripheral Vocal Motor Dynamics and Combinatory Call Complexity of Ultrasonic Vocal Production in Rats, in: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 45–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00005-6>

66. Riede, T., Borgard, H.L., Pasch, B., 2017. Laryngeal airway reconstruction indicates that rodent ultrasonic vocalizations are produced by an edge-tone mechanism. *R. Soc. Open Sci.* 4, 170976. <https://doi.org/10.1098/rsos.170976>
67. Rukšėnas Osvaldas, Griksienė Ramunė, 2007. V skyrius. Garso jutimas, in: *Sensorinių sistemų biofizika*. Vilniaus universiteto leidykla, Vilnius, p. 156.
68. Schwarting, R.K.W., Wöhr, M., 2018. Isolation-induced ultrasonic vocalizations in pups: A comparison between Long-Evans, Sprague–Dawley, and Wistar rats. *Dev. Psychobiol.* <https://doi.org/10.1002/dev.21738>
69. Shahrier, Mohd.A., Wada, H., 2018. Effects of prenatal ethanol exposure on acoustic characteristics of ultrasonic vocalizations in rat pups. *NeuroToxicology* 69, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.08.006>
70. Shair, H.N., 2018. Infantile Vocalizations in Rats, in: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 129–137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00012-3>
71. Sih, A., Bell, A.M., Johnson, J.C., Ziemba, R.E., 2004. Behavioral Syndromes: An Integrative Overview. *Q. Rev. Biol.* 79, 241–277. <https://doi.org/10.1086/422893>
72. Simola, N., Granon, S., 2018. Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.008>
73. Simon, F.W., Hodson, C.N., 2019. Animal Personality, in: *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90723-4>
74. Svirskis Gytis, 2007. Klausos signalų virsmų mechaniniai ir elektriniai mechanizmai, in: *Neurotransdukcija*. Vilniaus universitetas, Vilnius, p. 125.
75. Takahashi, N., Kashino, M., Hironaka, N., 2010. Structure of Rat Ultrasonic Vocalizations and Its Relevance to Behavior. *PLoS ONE* 5, e14115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014115>
76. Thomas, D.A., Barfield, R.J., 1985. Ultrasonic vocalization of the female rat (*Rattus norvegicus*) during mating. *Anim. Behav.* 33, 720–725. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(85\)80002-6](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(85)80002-6)
77. Thomas, D.A., Howard, S.B., Barfield, R.J., 1982. Male-produced postejaculatory 22-kHz vocalizations and the mating behavior of estrous female rats. *Behav. Neural Biol.* 36, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(82\)90802-0](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(82)90802-0)
78. Thomas, J.A., Moss, C.F., Vater, M., 2004. *Echolocation in Bats and Dolphins*. University of Chicago Press.
79. Van Daele, D.J., Cassell, M.D., 2009. Multiple forebrain systems converge on motor neurons innervating the thyroarytenoid muscle. *Neuroscience* 162, 501–524. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.005>
80. Wohlgemuth, M.J., Luo, J., Moss, C.F., 2016. Three-dimensional auditory localization in the echolocating bat. *Curr. Opin. Neurobiol.* 41, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.08.002>
81. Wright, J.M., Gourdon, J.C., Clarke, P.B.S., 2010. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology (Berl.)* 211, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1859-y>

82. Yovel, Y., Greif, S., 2018. Bats – Using Sound to Reveal Cognition, in: Bueno-Guerra, N., Amici, F. (Eds.), *Field and Laboratory Methods in Animal Cognition*. Cambridge University Press, pp. 31–59. <https://doi.org/10.1017/9781108333191.004>

1 Priedas. Skirtingų 50 kHz dažnio USV įvairovės sonogramos (Wright et al., 2010).

