

ĐẶC ĐIỂM PHÁT ÂM TRÊN CHUỘT NHẮT 3 ĐẾN 10 NGÀY TUỔIĐào Thu Hồng^{1,2}, Nguyễn Lê Chiến¹, Cấn Văn Mão¹, Trần Hải Anh^{1*}**TÓM TẮT:**

Phát âm siêu âm ở chuột sơ sinh khi bị tách mẹ (iUSV) phản ánh mức độ phát triển về giao tiếp giữa chuột non với mẹ cũng như tình trạng đáp ứng cảm xúc với những yếu tố tiêu cực. Nghiên cứu tiến hành ghi iUSV trên 60 chuột nhắt 3–10 ngày tuổi nhằm đánh giá các đặc điểm phát âm của chúng. Kết quả cho thấy âm thanh do chuột non phát ra thuộc hai dải tần số trên và dưới 35 kHz. Các âm thanh ở dải tần trên 35 kHz mang ý nghĩa giao tiếp không khác biệt theo giới, nhưng chuột 6–10 ngày tuổi tăng phát iUSV hơn so với các ngày trước đó. Số cuộc iUSV ở các chuột có phát âm không khác biệt theo giới nhưng có xu hướng tăng lên khi chuột từ 8 ngày tuổi và chuột cái thường phát âm nhiều hơn chuột đực. Các chỉ số khác (tần số, biên độ, năng lượng, độ hỗn tạp) không có sự khác biệt rõ rệt theo giới. Các âm thanh không mang ý nghĩa giao tiếp ở dải tần dưới 35 kHz không có sự khác biệt theo giới.

Từ khóa: âm siêu âm khi bị tách mẹ, chuột nhắt sơ sinh

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng âm thanh và phát âm là một trong những phương thức giao tiếp xã hội cơ bản ở nhiều loài động vật có xương sống bao gồm cả ở chuột. Chuột phát ra âm thanh ở dải tần số siêu âm trong các hoàn cảnh khác nhau trong quá trình phát triển và trưởng thành. Chuột sơ sinh non chưa hoàn thiện về thị giác, thính giác và khả năng vận động còn rất hạn chế, nên sự chăm nuôi của chuột mẹ là yếu tố tiên quyết giúp chúng tồn tại được. Do vậy, chuột non cần giao tiếp với chuột mẹ từ ngay sau khi chào đời và tiếng “khóc” của chuột con khi chào đời chính là thông báo để chuột mẹ cần tui ối giúp chuột con thoát ra [6]. Do còn chưa có lông hay lớp mỡ dưới da để giữ ấm cơ thể, chuột sơ sinh bị mất nhiệt nhanh chóng khi bị tách đàn và chúng cần “khóc” gọi để chuột mẹ có thể tìm, tha chúng về ổ [7]. Do vậy,

phát âm siêu âm khi bị tách mẹ (isolation induced ultrasound vocalization – iUSV) ở chuột sơ sinh phản ánh mức độ phát triển về giao tiếp giữa chuột non với mẹ cũng như tình trạng đáp ứng cảm xúc với những yếu tố tiêu cực [8]. Hơn nữa, nghiên cứu về phát âm còn là một công cụ hữu ích trong các mô hình động vật về các bệnh rối loạn tâm thần [8]. Ở trong nước, hướng nghiên cứu về phát âm trên động vật còn khá mới mẻ, bởi vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm tìm hiểu và phân tích đặc điểm phát âm ở chuột nhắt sơ sinh 3 đến 10 ngày tuổi khi bị tách đàn.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**2.1. Đối tượng nghiên cứu**

Nghiên cứu tiến hành trên 60 chuột nhắt trắng khỏe mạnh (29 đực và 31 cái) dòng Swiss, 3–10 ngày tuổi. Động vật nghiên cứu được sinh ra từ các chuột mẹ do Trung tâm sản xuất động vật thí nghiệm chuẩn thức, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuột sơ sinh được đặt nằm trên một đĩa thủy tinh và đặt trong một hộp xốp cách âm ở nhiệt độ $22 \pm 1^\circ \text{C}$. Đầu dò siêu

¹ Học viện Quân y² Đại học Y dược Hải phòng

*Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Trần Hải Anh

Email: anhhttr@yahoo.com

Ngày nhận bài: 31/8/2016

Ngày nhận bài phản biện: 23/9/2016

Ngày chấp nhận đăng: 21/10/2016

âm D230 (Pettesson, Thụy Điển) đặt phía trên, cách chuột khoảng 5 cm, dò phát hiện âm thanh với chế độ DIV (theo dõi và thu âm tự động toàn dải tần 10–120 kHz). Âm siêu âm do chuột phát ra trong thời gian 10 phút được thu và lưu trữ tại máy tính trung tâm dưới dạng tệp wav (chế độ ghi đơn kênh, mã hóa 16 bit, và tần số lấy mẫu 44,1 KHz). Các tệp dữ liệu này sau đó tiếp tục được phân tích bằng chương trình Raven Pro 1.5 (The Cornell Lab of Ornithology, Mỹ) qua các bước sau: (1) Âm thanh được lọc triệt tần 50–60 Hz; (2) Xây dựng âm phổ đồ (thông số phổ: biến đổi Fourier, Hann window 512 sample, 80% time window overlap).

Các cuộc phát âm được phân định theo bộ dò tần số với dải tần từ 10–120 kHz; thời khoảng cuộc phát âm từ 10–500 mili giây và phân cách tối thiểu giữa 2 cuộc phát âm là 10 mili giây.

Các cuộc phát âm được phân tích để xác định các thông số:

- Số cuộc phát âm trong thời gian 10 phút.
- Thời gian trung bình cuộc phát âm (mili giây): là thời gian của các cuộc phát âm/tổng số cuộc phát âm.

- Cường độ âm (dB): là giá trị năng lượng tối đa của âm.

- Tần số âm (kHz): là tần số mà tại đó cường độ âm đạt mức tối đa.

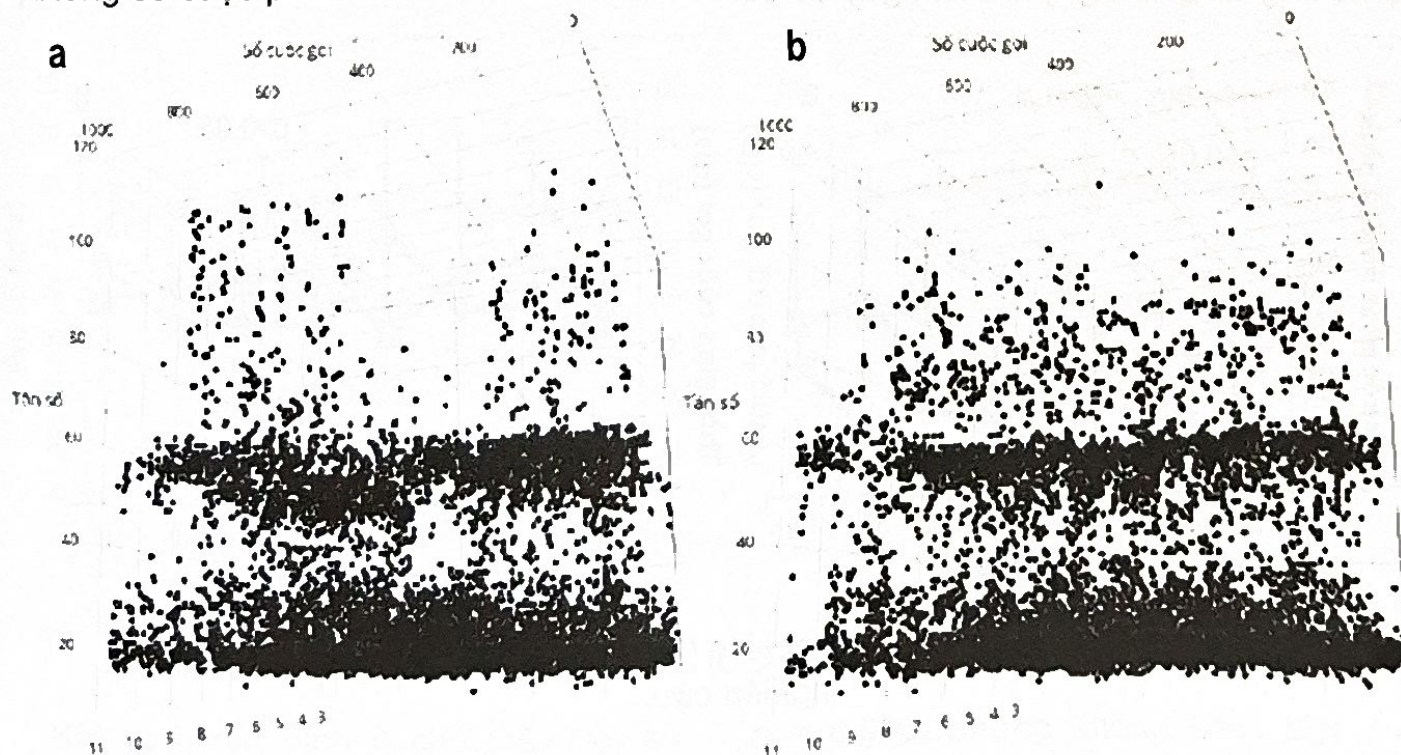
- Biên độ âm (kU): là giá trị tối đa của cuộc phát âm thể hiện trên đồ thị dạng âm (waveform).

- Độ hỗn tạp (entropy) của âm: là đo lường về mức độ hỗn tạp của âm thanh thông qua phân tích phân phối năng lượng của cuộc phát âm. Giá trị entropy càng cao tương ứng âm thanh được cấu thành từ càng nhiều tần số, còn âm thuần chỉ có một tần số sẽ có giá trị entropy thấp nhất.

Đặc tính âm thanh của chuột sơ sinh từ 3–10 ngày tuổi được so sánh theo giới và theo ngày bằng phân tích phương sai 2 nhân tố có lặp, chạy trên chương trình IBM SPSS Statistic 22.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Đặc tính về tần số do chuột chung cả hai giới phát ra trong tối đa 1000 cuộc gọi ở những ngày đầu sau sinh được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Phân bố âm tần trong 1000 cuộc gọi ở chuột đực (a) và chuột cái (b) từ 3–10 ngày tuổi. Mỗi cuộc gọi được minh họa bằng một dấu chấm.

Kết quả trên hình 1 cho thấy các âm thanh do chuột phát ra trong những ngày đầu sau sinh chủ yếu ở hai dải tần số cơ bản là từ 15–30 kHz và từ 40–80 kHz. Kết quả này cũng tương đồng với nhiều báo cáo trước đây, cho rằng âm thanh do chuột sơ sinh phát ra ở hai dải tần số cơ bản nằm trong khoảng 4–35 kHz và 35–110 kHz. Trong đó, đáng lưu tâm là các âm thanh ở dải tần trên 35 kHz thường

mang ý nghĩa giao tiếp [1],[6]. Do vậy, trong báo cáo này chúng tôi chia các chỉ số đặc điểm âm theo hai nhóm dải tần: trên 35 kHz và tới 35 kHz, và tập trung hơn vào phân tích các đặc tính âm mang ý nghĩa giao tiếp.

3.1. Đặc điểm âm có dải tần trên 35 kHz

Đặc điểm về tỷ lệ chuột phát iUSV được trình bày trên bảng 1.

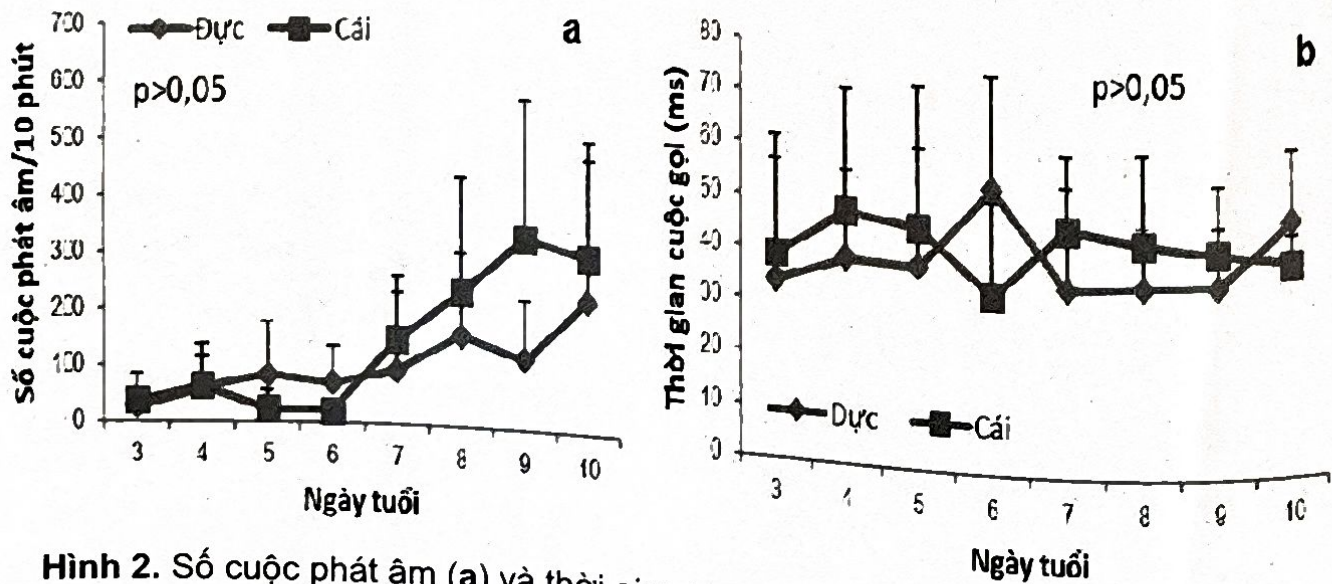
Bảng 1. Tỷ lệ (%) chuột phát iUSV qua các ngày

		Ngày tuổi							
		3	4	5	6	7	8	9	10
Giới tính	Đực (n= 29)	69,0	93,1	79,3	89,7	100	100	96,6	100
	Cái (n = 31)	71,2	77,4	93,5	90,3	93,3	96,8	96,8	100
	p	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả trên bảng 1 cho thấy tỷ lệ chuột phát iUSV không có sự khác biệt theo giới từ ngày 3 đến ngày 10, ngoại trừ ở ngày 7 tỷ lệ phát âm ở chuột đực cao hơn chuột cái ($p < 0,05$, kiểm định χ^2). Đồng thời ở cả hai giới tỷ lệ phát âm có xu hướng tăng từ ngày 6 đến ngày 10 so

với các ngày trước đó, nhất là ngày 3 ($p < 0,01$, Student T-test).

Kết quả phân tích các đặc tính iUSV ở chuột có phát âm (20 chuột đực và 23 chuột cái) qua các ngày nghiên cứu được trình bày trên các hình 2–4.



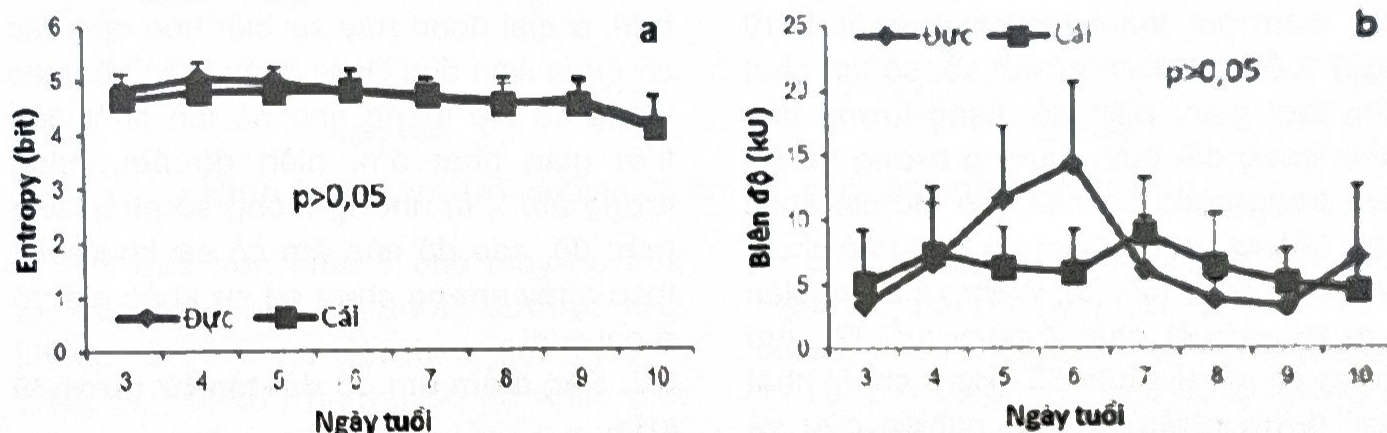
Hình 2. Số cuộc phát âm (a) và thời gian trung bình cuộc gọi (b) qua các ngày nghiên cứu.

Số cuộc phát âm (số cuộc gọi) trong 10 phút thể hiện trên hình 2 cho thấy không

có sự khác biệt theo giới ($F_{(1,25)} = 2,338$, $P = 0,139$) nhưng có khác biệt theo ngày

($F_{(3,179)} = 14,782$, $p = 0,000$) và có tương tác giữa yếu tố ngày và giới ($F_{(3,179)} = 3,178$, $p = 0,026$). Nhìn chung, chuột có xu hướng phát iUSV tăng lên bắt đầu từ 8 ngày tuổi ($p < 0,01$, so sánh cặp, hiệu chỉnh Bonferoni) và ở giai đoạn này, chuột cái thường phát nhiều hơn chuột đực.

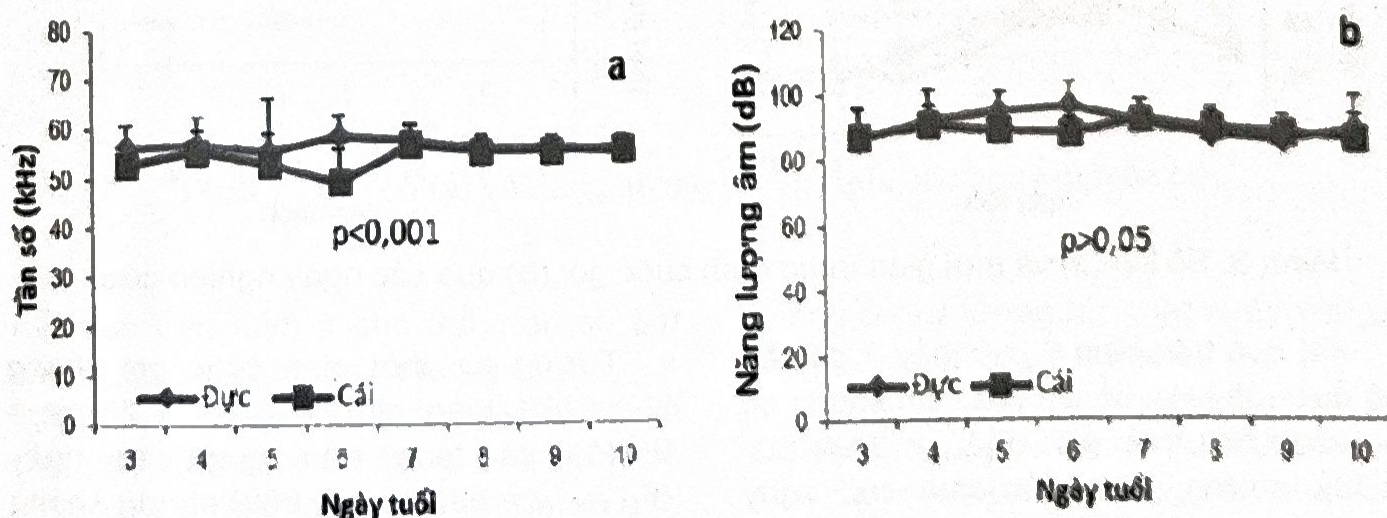
Thời gian trung bình cuộc gọi không có sự khác biệt theo giới ($F_{(1,34)} = 1,225$, $p = 0,276$) và theo ngày ($F_{(4,156,9)} = 0,765$, $p = 0,567$) nhưng có sự tương tác giữa yếu tố ngày và giới ($F_{(4,6,156,9)} = 3,1133$, $p = 0,012$).



Hình 3. Entropy (a) và biên độ iUSV (b) qua các ngày nghiên cứu.

Kết quả trên hình 3 cho thấy độ hỗn tạp của iUSV không khác biệt theo giới ($F_{(1,37)} = 2,762$, $p = 0,105$) nhưng giảm dần theo ngày ($F_{(4,9;184,3)} = 16,28$, $p = 0,000$), rõ rệt ở ngày 8–10 ($p < 0,05$, phân tích cặp, hiệu chỉnh Bonferoni) và không có tương tác giữa yếu tố ngày và giới ($F_{(4,9;184,3)} = 0,791$, $p = 0,557$).

Biên độ âm không khác biệt theo giới ($F_{(1,34)} = 2,108$, $p = 0,156$), nhưng khác biệt giữa các ngày ($F_{(4,7;160,7)} = 11,191$, $p = 0,000$), rõ rệt ở 5–7 ngày tuổi ($p < 0,01$, phân tích cặp, hiệu chỉnh Bonferoni) và có sự tương tác giữa ngày và giới ($F_{(4,7;160,7)} = 10,136$, $p = 0,000$).



Hình 4. Tần số (a) và năng lượng iUSV (b) qua các ngày nghiên cứu.

Kết quả trên hình 4 cho thấy tần số iUSV chuột phát qua các ngày nghiên cứu có sự khác biệt theo giới ($F_{(1,34)} = 20,997$,

$p = 0,000$) nhưng không khác biệt theo ngày ($F_{(3,2,111,9)} = 1,801$, $p = 0,146$) và có

tương tác giữa yếu tố ngày và giới ($F_{(3,2;111,9)} = 3,736, p = 0,011$).

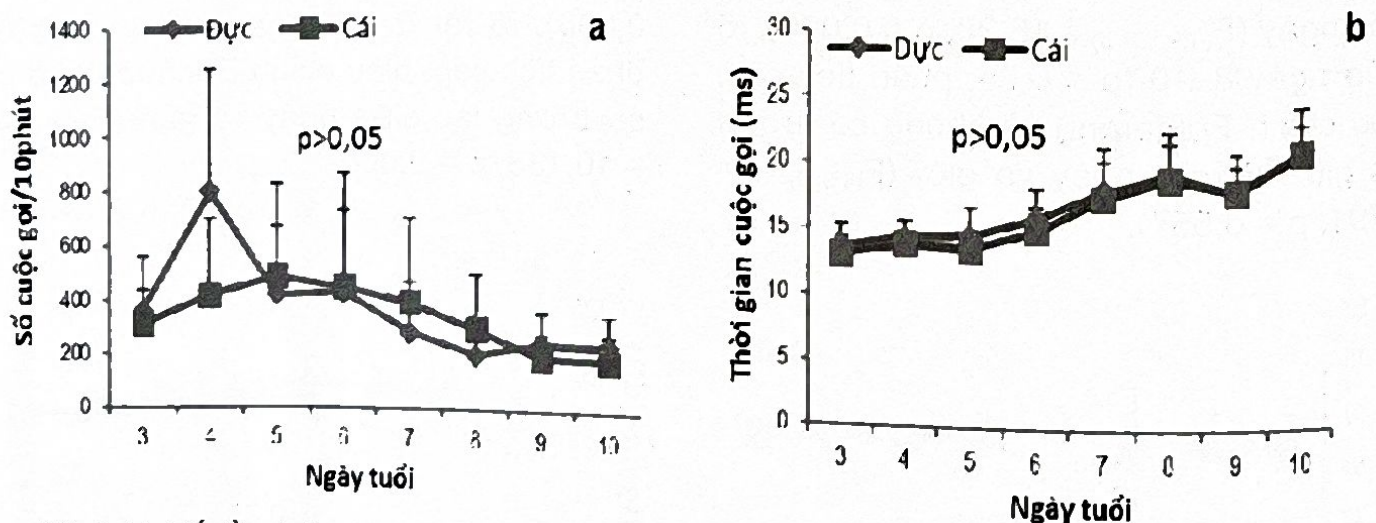
Năng lượng âm không khác biệt theo giới ($F_{(1;39)} = 2,255, p = 0,141$) nhưng có sự khác biệt theo ngày ($F_{(4,6;182,6)} = 5,293, p = 0,000$) và có tương tác giữa ngày và giới ($F_{(4,6;182,6)} = 3,529, p = 0,006$).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các đặc điểm âm thanh do chuột nhắt 3–10 ngày tuổi phát ra như tần số, số lần phát âm, thời gian, biên độ, năng lượng đều nằm trong dải bình thường tương tự kết quả trong công bố của các tác giả khác như D'Amato và cs. nghiên cứu trên chuột nhắt 4–8 ngày tuổi [2], Wöhr và cs. nghiên cứu trên chuột nhắt 7 ngày tuổi [9]. Âm thanh có dải tần trên 35 kHz ở chuột nhắt non được nhiều tác giả nghiên cứu và nhận thấy đây là dải tần có chức năng giao tiếp, nằm trong dải tần số siêu âm mà tai người không nghe thấy, còn ở chuột ngưỡng nghe nằm trong dải từ 1–

100 kHz [6],[9]. Chuột nhắt trong giai đoạn 2 tuần đầu sau sinh là thời kỳ chưa mở mắt, chưa mọc lông hoặc lông mọc còn thưa và cần sữa mẹ để tồn tại. Vì vậy trong giai đoạn này khi bị tách khỏi mẹ và ổ, chuột non phát ra iUSV như là tiếng “kêu cứu” do lạnh, do đói và là tín hiệu để chuột mẹ tìm và tha chúng về lại ổ. Đồng thời, ở giai đoạn này sự biệt hóa của các cơ quan sinh dục chưa hoàn toàn nên các thông số âm thanh như số lần phát âm, thời gian phát âm, biên độ âm, năng lượng âm... là những thông số phản ánh mức độ, cao độ của âm có sự khác biệt theo ngày nhưng chưa có sự khác biệt rõ ở hai giới.

3.2. Đặc điểm âm có dải tần từ dưới 35 kHz

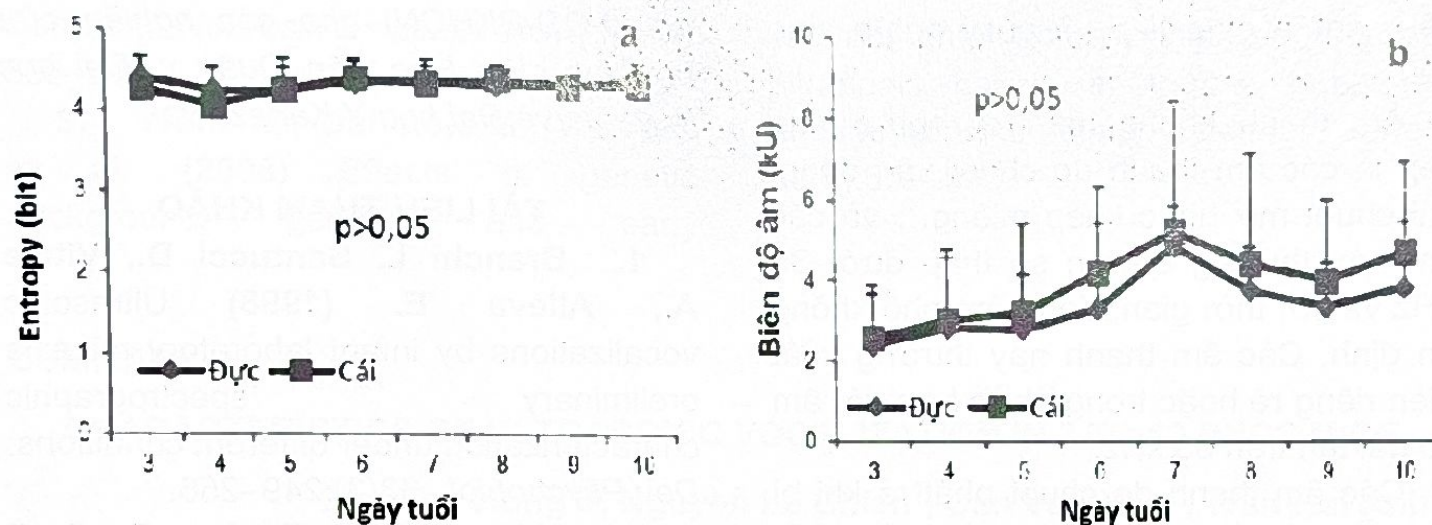
Ở dải tần số từ dưới 35 kHz, tất cả các chuột đều phát âm (29 con đực, 31 con cái). Một số đặc điểm âm thanh ở dải tần số này được trình bày trên các hình 5–8.



Hình 5. Số lần (a) và thời gian trung bình cuộc gọi (b) qua các ngày nghiên cứu.

Kết quả trên hình 5 cho thấy ở dải tần số dưới 35 kHz, số lần phát âm không có sự khác biệt theo giới ($F_{(1;43)} = 0,86, p = 0,36$), nhưng giảm dần qua các ngày ($F_{(3,9;167,2)} = 14,48, p = 0,000$) và có sự tương tác giữa ngày và giới ($F_{(3,9;167,2)} = 4,85, p = 0,001$).

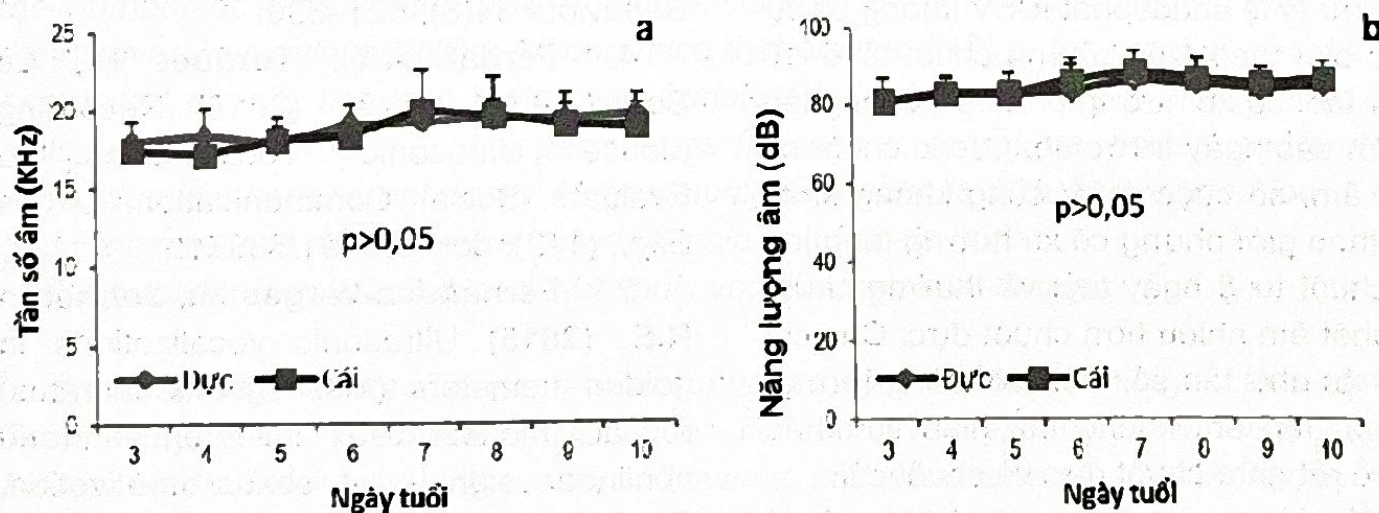
Tương tự, thời gian cuộc gọi không khác biệt theo giới ($F_{(1;41)} = 2,26, p = 0,141$) và tăng dần qua các ngày ($F_{(4,9;201,4)} = 59,3, p = 0,000$) nhưng không có tương tác giữa ngày và giới ($F_{(4,9;201,4)} = 59,3, p = 0,921$).



Hình 6. Entropy (a) và biên độ âm (b) qua các ngày nghiên cứu.

Kết quả trên hình 6 cho thấy độ hỗn tạp của âm thanh có tần số dưới 35 kHz không có sự khác biệt theo giới ($F_{(1;42)} = 2,43$, $p = 0,127$) nhưng có sự khác biệt theo ngày ($F_{(4,8;200,6)} = 1,61$, $p = 0,000$) và không có tương tác giữa ngày và giới ($F_{(4,8;200,6)} = 59,3$, $p = 0,162$).

Biên độ âm cũng không có sự khác biệt theo giới ($F_{(1;41)} = 1,87$, $p = 0,178$) và có sự khác biệt theo ngày ($F_{(4,8;195,9)} = 11,76$, $p = 0,000$), nhưng cũng không có sự tương tác giữa ngày và giới ($F_{(4,8;195,9)} = 0,365$, $p = 0,865$).



Hình 7. Tần số (a) và năng lượng âm (b) qua các ngày nghiên cứu.

Kết quả trên hình 7 cho thấy tần số âm không có sự khác biệt theo giới ($F_{(1;39)} = 3,153$, $p = 0,084$) nhưng có khác biệt giữa các ngày ($F_{(7;273)} = 11,55$, $p = 0,000$), và không có sự tương tác giữa ngày và giới ($F_{(7;273)} = 1,76$, $p = 0,095$).

Về năng lượng âm, kết quả cho thấy không có sự khác biệt theo giới ($F_{(1;42)} = 1,24$, $p = 0,272$) nhưng có sự khác biệt theo ngày ($F_{(5,3;221,5)} = 14,9$, $p = 0,000$), và

không có sự tương tác giữa ngày với giới ($F_{(5,3;221,5)} = 0,73$, $p = 0,606$).

Trong nghiên cứu này, máy dò âm D230 đã loại được các âm có tần số dưới 10 kHz, mà các tiếng động nền phần lớn nằm trong dải dưới 10 kHz. Vì vậy, dải âm tần số dưới 35 kHz không bao gồm các âm nhiễu hay tiếng động nền. Dựa trên tác động lên hành vi, âm thanh thu được trong quá trình ghi âm ở chuột bị tách mẹ có thể được chia thành âm thanh không

có ý nghĩa giao tiếp và có ý nghĩa giao tiếp.

Âm thanh không mang ý nghĩa giao tiếp là các âm thanh do chuột vận động, khi chuột mở hoặc khép miệng... và các âm này thường có tần số thấp dưới 35 kHz và với thời gian, dạng âm phổ không ổn định. Các âm thanh này thường xuất hiện riêng rẽ hoặc trong phức hợp với âm có dải tần trên 35 kHz.

Các âm thanh do chuột phát ra khi bị tách mẹ thuộc nhóm âm mang ý nghĩa giao tiếp, có tần số trên 35kHz và có các đặc tính âm ổn định (thời gian, dạng âm phổ,...) [1],[6].

4. KẾT LUẬN

Âm thanh chuột nhắt từ 3 đến 10 ngày tuổi phát ra nằm trong hai dải tần trên và dưới 35 kHz.

Âm thanh mang ý nghĩa giao tiếp với dải tần trên 35 kHz có những đặc điểm nổi trội như tỷ lệ chuột phát iUSV không có sự khác biệt theo giới, nhưng chuột từ 6–10 ngày tuổi có xu hướng phát iUSV tăng lên so với các ngày trước đó. Ở các chuột có phát âm, số cuộc iUSV cũng không khác biệt theo giới nhưng có xu hướng tăng lên khi chuột từ 8 ngày tuổi và thường chuột cái phát âm nhiều hơn chuột đực. Các chỉ số khác như tần số, biên độ, năng lượng, độ hỗn tạp âm không thể hiện sự khác biệt rõ rệt giữa chuột đực và chuột cái.

Đối với các âm thanh có dải tần dưới 35 kHz, toàn bộ các chuột nghiên cứu đều ghi nhận được có phát ra các âm thanh có dải tần không mang ý nghĩa giao tiếp và các đặc tính âm thanh không có sự khác biệt theo giới.

Nghiên cứu này là bước khởi đầu cho hướng nghiên cứu còn khá mới mẻ về đặc tính phát âm liên quan tới phát triển ở động vật nói chung và trên động vật gặm nhấm nói riêng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện nhờ kinh phí từ đề tài Nghị định thư của Bộ Khoa học Công nghệ

(2109/QĐ-BKHCN) cho các nghiên cứu hợp tác giữa Học viện Quân sự Đại học Toyama và Đại học Y Kanazawa

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Branchi I., Santucci D., Vitale A., Alleva E. (1998) Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Dev Psychobiol.*, 33(3):249–256.
2. D'Amato F.R., Scalera E., Sarli C., Moles A. (2005) Pups call, mothers rush: does maternal responsiveness affect the amount of ultrasonic vocalizations in mouse pups? *Behav Genet.*, 35(1):103–112.
3. Ehret G., Bernecker C. (1986) Low-frequency sound communication by mouse pups (*Mus musculus*): wriggling calls release maternal behaviour. *Animal Behaviour* 34(3), 821–830.
4. Ferhat A.T., Torquet N., Le Sourd A.M., et al. (2016) Recording Mouse Ultrasonic Vocalizations to Evaluate Social Communication. *J Vis Exp.*, (112): doi:10.3791/53871.
5. Fernández-Vargas M., Johnston R.E. (2015) Ultrasonic vocalizations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) reveal modest sex differences and nonlinear signals of sexual motivation. *PLoS One*, 10(2):e0116789.
6. Haack B., Markl H., Ehret G. (1983) Sound communication between parents and offspring. In: Willott J (ed.), *The Auditory psychobiology of the mouse* (pp. 57–97). Springfield: Thomas, C.C..
7. Portfors C.V. (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.*, 46(1):28–34.
8. Scattoni M.L., Crawley J., Ricceri L. (2009) Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental

disorders. *Neurosci Biobehav Rev.*, 33(4): 508–515.

9. Wöhr M., Dahlhoff M., Wolf E., et al. (2008) Effects of genetic background, gender, and early

environmental factors on isolation-induced ultrasonic calling in mouse pups: an embryo-transfer study. *Behav Genet.*, 38(6):579–595.

SUMMARY

CHARACTERISTICS OF ULTRASONIC VOCALIZATION IN 3 TO 10 PNDS MICE

Dao Thu Hong^{1,2}, Nguyen Le Chien¹, Can Van Mao¹, Tran Hai Anh^{1*}

¹Vietnam Military Medical University

²Hai Phong University of Medicine and Pharmacy

In neonatal mice, isolation induced ultrasonic vocalization (iUSV) expresses not only the development of communication between a pup and its dam, but also the emotional response of the pup to negative stimuli. This study recorded iUSVs that emitted from 60 mice of 3–10 postnatal days (PNDs) in order to evaluate rodent vocalization characteristics. The results showed that ultrasound recorded can be categorized into two bandwidths of above and below 35 kHz. In which, sound with frequencies higher than 35 kHz having the communicative meaning expressed no difference between genders, but the number of mice emitted iUSVs increased from 6–10 PNDs compared with that of themselves in previous PNDs. Among mice that emitted iUSVs, the number of calls also expressed equally between males and females, but mice from 8 day-old boosted their calls, greater in females. Other parameters (frequency, amplitude, power, and entropy) were identical between genders. Uncommunicative sounds with frequencies lower than 35 kHz expressed no difference between male and female mice.

Keywords: isolation induced ultrasonic vocalization, mouse pups

Acknowledgements: This work was supported by a Vietnam Ministry of Science and Technology grant (2109/QĐ-BKHCN) for collaborative researches among Vietnam Military Medical University, University of Toyama, and Kanazawa Medical University.