

Z warsztatów badawczych i doświadczeń klinicznych

**Wanda Dyr¹, Paweł Krząścik², Krzysztof Dudek³,
Anna Witanowska⁴, Jolanta Dzierzkowska⁴, Wojciech Kostowski^{1,2}**

¹Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego
Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie,

²Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej i Doświadczalnej
Akademii Medycznej w Warszawie,

³Klinika Chirurgii Ogólnej i Chorób Wątroby
Akademii Medycznej w Warszawie,

⁴Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej w Warszawie

NOWA LINIA SZCZURÓW WISTAR SELEKCJONOWANYCH W KIERUNKU NADMIERNEJ PREFERENCJI ALKOHOLU: charakterystyka behawioralna

WSTĘP

Zwierzęce modele są wartościowym narzędziem badawczym funkcji układu nerwowego i zachowania. Mogą być bowiem wielce użyteczne w badaniu mechanizmów uzależnień oraz poszukiwania analogii tych mechanizmów u ludzi i zwierząt.

Stosując selektywną, ukierunkowaną na uzyskanie posiadanego fenotypu hodowlę, w laboratoriach uzyskano wiele linii szczurów nisko i wysoko preferujących alkohol. Linie te uzyskano kojarząc zwierzęta stada wyjściowego na podstawie spontanicznej preferencji alkoholu. W tym teście szczury przebywają na ogół w indywidualnych klatkach z nieograniczonym dostępem do alkoholu, wody i pokarmu przez wiele tygodni. Samce i samice wykazujące wysokie spożycie alkoholu tworzą pary rodzicielskie dla linii o dużej preferencji do alkoholu. Odpowiednio, małe spożycie alkoholu u samic i samców daje początek dla linii o niskiej preferencji do alkoholu.

Zasadniczą kwestią w badaniach nad alkoholizmem stanowi pytanie, dlaczego ludzie piją, dlaczego piją w nadmiarze i dlaczego niektórzy nie są w stanie przerwać

Praca wykonana w ramach zadań statutowych Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (nr tematu 55/99).

picia nawet wobec wielu zagrożeń i powikłań z picia wynikających. Alkoholizm jest chorobą, na którą zapadają nie tylko ludzie, uzależnić można też zwierzęta. Uczyniono zatem wiele wysiłku, aby rozwinąć zwierzęce modele spontanicznego picia czy picia instrumentalnego (samopodawania alkoholu) w celu uzyskania maksymalnej informacji o neuronalnym podłożu tej choroby.

Linie szczurów otrzymane poprzez selekcję genetyczną pozyskano w niewielu laboratoriach badawczych. Są to: ALKO alcohol/nonalcohol (AA/ANA) (4), Alcohol Preferring-/Nonpreferring (P/NP) (6), UChB/UChA – (University of Chile B i A) (8), HAD/LAD (High-/Low-Alcohol Drinking) (6) i sP/SNP (Sardinian Alcohol-preferring-/nonpreferring) (5). Picie alkoholu przez szczury linii P, HAD, AA, sP i UChB jest bardzo znaczące i często przewyższa 5g/kg/24h.

Większość laboratoriów zaakceptowała kryteria, które powinien spełniać model „zwierzęcego alkoholizmu”, zostały one przedstawione i przeanalizowane najszerzej przez Cicero (2). Wymogi te są następujące:

1. Zwierzęta powinny pić same spontanicznie alkohol.
2. Powinny rozwijać się oznaki zależności fizycznej od etanolu, czyli objawy zespołu abstynencyjnego po okresie chronicznego picia.
3. Powinna rozwijać się metaboliczna i funkcjonalna tolerancja na etanol w wyniku długotrwałego picia.
4. Alkohol powinien być spożywany w wyniku własnych efektów farmakologicznych a nie dla jego wartości kalorycznych, smakowych lub zapachowych.
5. Zwierzęta powinny pokonywać przeszkody i wykonywać pracę (odruch instrumentalny), aby pozyskać alkohol.

W laboratorium Zakładu Farmakologii i Fizjologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii od kilku lat trwają prace nad rozwinięciem linii szczurów o genetycznej preferencji do alkoholu i równoległej linii zwierząt o rozwiniętej niskiej preferencji lub do unikania alkoholu (1). W uzyskanych obecnie pokoleniach tych linii, zwierzęta linii wysoko preferującej WHP (Warsaw High Preferring) piją duże ilości alkoholu (5g/kg/24h i więcej) podczas gdy szczury linii nisko preferującej WLP (Warsaw Low Preferring) piją mniej niż 2 g/kg/24h alkoholu.

W niniejszej pracy analizowano:

1. Strukturę spożycia alkoholu w trzech kolejnych pokoleniach tj. pokoleniu 15, 16, 17 szczurów linii WHP i WLP. Badano również dobowe, w godzinnych przedziałach picie alkoholu w pokoleniu 16 szczurów WHP i WLP.
2. Badano poziom alkoholu we krwi po okresie spontanicznego picia dobowego w obydwu grupach zwierząt w pokoleniu 16.
3. W pokoleniu 16 badano także cechy zespołu abstynencyjnego po odstawieniu alkoholu w 14 i 36 godzin u szczurów linii WHP i WLP.

MATERIAŁ I METODYKA

Zwierzęta przebywały w pojedynczych klatkach metalowych, w pomieszczeniu klimatyzowanym z regulowanym oświetleniem (światło 8.00-20.00) i tem-

peraturą 20-22°C. Do badania użyto zwierzęta 15, 16, 17 generacji, linii szczurów WHP i WLP. Badano procentowy rozkład picia alkoholu w populacji obu linii (w g/kg/24h) w przedziałach 0-2 g/kg/24h; 2-4 g/kg/24h; 4-6 g/kg/24h; 6-8 g/kg/24h i powyżej. Szczury miały wolny dostęp do 10% roztworu alkoholu i wody znajdujących się w 2 osobnych skalowanych pojemnikach zaopatrzonych w specjalne poidelka (two bottle test). Położenie pojemników codziennie zmieniano. Co godzinę przez całą dobę mierzono ilość pitego alkoholu przez szczury należące do obu linii.

Poziom etanolu we krwi oznaczano przy pomocy testu Alcohol Reagent firmy DIALAB (9). Polega on na, katalizowanej enzymatycznie przez dehydrogenazę alkoholową, reakcji utleniania alkoholu do aldehydu octowego przez NAD⁺, który ulega redukcji do NADH. Z kolei NADH jest oznaczany fotometrycznie przy długości fali 340 nanomikronów (nm). Poziom etanolu badano u szczurów WHP i WLP. Zwierzęta, przez okres 2 tygodni, miały wolny dostęp do alkoholu, wody i pokarmu, krew z ogona pobierano w godz. 9.00-10.00.

Po 14 i 36 godzinach od odstawienia alkoholu badano zespół abstynencyjny u szczurów WHP i WLP, mających wolny całodobowy dostęp do alkoholu przez okres 2 tygodni. Oceniano takie cechy zespołu, jak piloerekcję, wytrzeszcz gałek ocznych, sztywność mięśniową i wrażliwość na bodźce zewnętrzne. Oceniano także gotowość drgawkową na silny bodziec dźwiękowy (ok. 100 db przez 30 sek.) indukowaną w specjalnie skonstruowanym urządzeniu.

WYNIKI

Zwierzęta linii WHP i WLP w pokoleniu 15 różnią się zasadniczo pod względem wielkości picia. Największa różnica występuje przy analizie kryterium picia małego czyli 0-2 g/kg/24h, które spełnia bardzo mała liczba zwierząt z linii WHP. Stwierdziliśmy, że tylko 4,8% zwierząt z linii WHP pije alkohol w przedziale od 0-2 g/kg/24h, podczas gdy dla linii WLP wartość ta wynosi aż 57%. Procentowy udział zwierząt w picciu alkoholu wzrasta w linii WHP proporcjonalnie do wzrostu przedziału spożycia, czego nie obserwuje się w grupie szczurów WLP (Tabela 1). Z przedstawionych danych widać, że ilość zwierząt linii WLP pijących coraz większe ilości alkoholu wyraźnie maleje tak, że w grupie tej nie ma zwierząt spożywających alkohol w zakresie 6-8 g/kg/24h, natomiast w grupie WHP jest ich 22,5%, a powyżej 8 g/kg/24h pije aż 43,5% zwierząt linii WHP.

Podobny rozkład procentowy zwierząt w obydwu liniach obserwuje się w pokoleniu 16. Tutaj udział zwierząt pijących coraz większe ilości alkoholu (wyrażone w g/kg/24h) przedstawiają się podobnie jak w pokoleniu 15. W zakresie picia alkoholu w ilości od 0-2 g/kg/24h udział procentowy WHP wynosi 19,7%, a w linii WLP wynosi on aż 56% (Tabela 1).

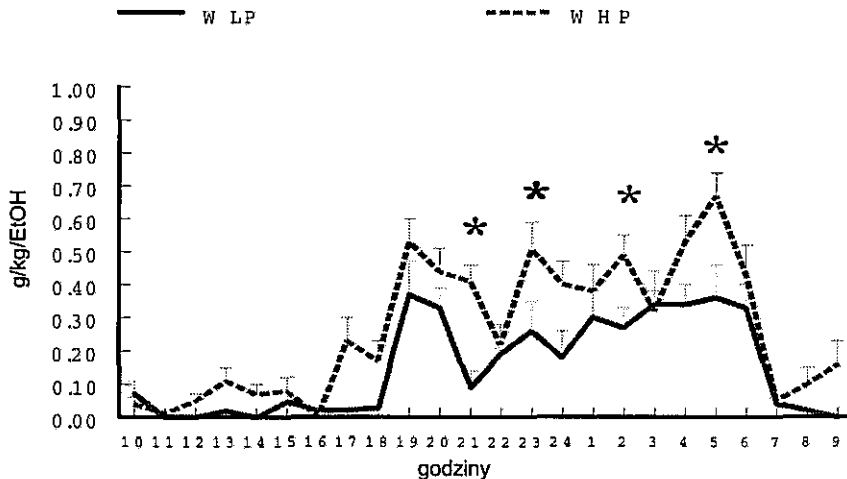
W pokoleniu 17, podobnie jak w dwóch poprzednich, aż 59,5% zwierząt z populacji linii WLP pije alkohol w zakresie od 0-2 g/kg/24h, nie znaleziono natomiast zwierząt pijących więcej niż 8 g/kg/24h (Tabela 1).

TABELA 1

Procentowy udział populacji szczurów WHP (Warsaw High Preferring) i WLP (Warsaw Low Preferring) pokolenia 15, 16, 17 w picu alkoholu (EtOH) w zakresie 0-8 g/kg/24h i więcej.

EtOH (G/kg/24)	WHP			WLP		
	Pokolenie15	Pokolenie16	Pokolenie17	Pokolenie15	Pokolenie16	Pokolenie17
0-2	4,8%	19,7%	28%	57%	56%	59,5%
4-6	17,8%	25,0%	17,3%	14,2%	8,5%	8,5%
6-8	22,5%	30,0%	22%	0,0%	4,9%	6,4%
>8	43,5%	18,5%	11%	0,0%	1,2%	0%

Wykazano, że szczury WHP piją znacznie więcej, w porównaniu do szczurów WLP, w godzinach nocnych (o godzinie 5.00 spożycie jest największe Ryc. 1).



Ryc. 1. Cogodzinny, dobowy rozkład picia alkoholu szczurów WHP i WLP. * $p < 0,05$ vs WLP.

Badając stężenia alkoholu we krwi u szczurów linii WHP i WLP (bezpośrednio po okresie picia całonocnego) stwierdzono, że są one podobne, pomimo znacznych różnic w całodobowym (i całonocnym) spożyciu alkoholu przez zwierzęta obu linii (Tabela 2).

TABELA 2

Stężenie alkoholu we krwi u szczurów WHP i WLP mierzone po okresie spontanicznego dobowego picia alkoholu, $p < 0,01$.

Grupa	Picie EtOH	EtOHg/dl-krew
WHP	4,27±0,5g/kg/24h	0,045±0,003
WLP	1,78±0,2g/kg/24h*	0,06±0,01

Zespół abstynencyjny mierzony 14 i 36 godzin od odstawienia alkoholu u szczurów WHP i WLP wykazuje również znamienne różnice w porównaniu do tych samych parametrów mierzonych w grupie szczurów WLP (Tabela 3 i 4). U szczurów linii WHP pojawiły się takie objawy, jak piloerekcja, sztywność mięśniowa, zwiększona wrażliwość na bodźce zewnętrzne. U zwierząt linii WLP objawy takie praktycznie nie wystąpiły. Nie obserwowano natomiast pojawienia się drgawek tak spontanicznych, jak i pod wpływem silnego sygnału dźwiękowego.

TABELA 3

Cechy zespołu abstynencyjnego u szczurów WHP i WLP mierzone 14 godz. od odstawienia alkoholu, * $p < 0,05$ vs WLP. Wielkości średnie \pm SEM (N=8-10 zwierząt).

	WHP	WLP
Piloerekcja	0,55 \pm 0,17*	0,0
Wytrzeszcz	0,0	0,0
Sztywność mięśniowa	0,78 \pm 0,15*	0,17 \pm 0,17
Wrażliwość na bodźce zewnętrzne	1,11 \pm 0,11*	0,5 \pm 0,22

TABELA 4

Cechy zespołu abstynencyjnego u szczurów WHP i WLP mierzone 36 godz. od odstawienia alkoholu, * $p < 0,05$ vs WLP.

	WHP	WLP
Piloerekcja	0,50 \pm 0,0*	0,08 \pm 0,08
Wytrzeszcz	0,0	0,0
Sztywność mięśniowa	1,0*	0,5 \pm 0,22
Wrażliwość na bodźce zewnętrzne	1,11 \pm 0,11*	0,4 \pm 0,17

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Analiza danych przedstawiona w Tabeli 1 ukazuje wyraźnie, że szczury grupy WHP spontanicznie piją duże ilości alkoholu w warunkach wolnego wyboru między 10% roztworem alkoholu a wodą. Porównując poziom picia ze szczurami z linii WLP można zauważyć, że przeważająca większość szczurów z grupy WLP pije małe ilości alkoholu zawierające się w granicach od 0-2 g/kg/24h, natomiast taki profil picia wykazuje mniej niż 5% zwierząt linii WHP. W przeciwieństwie z kolei do szczurów z grupy WLP, aż 45% szczurów WHP (pokolenie 15) pije alkohol w ilości przekraczającej 8 g/kg/24h. Spontaniczne picie alkoholu przez szczury WHP w warunkach wolnego wyboru z wodą spełnia jedno z podstawowych kryteriów zwierzęcego „genetycznego” modelu alkoholizmu, chociaż dla pełnego i prawidłowego stwierdzenia uzależnienia wymagane są też inne objawy, głównie wytworzenia odruchu instrumentalnego wzmacnianego alkoholem i nawrotu tej reakcji po okresie abstynencji. Spontaniczne picie alko-

holu w ilości 5 do 8 g/kg/24h i więcej wykazano u szczurów linii P, HAD (6), szczury AA (4) UChB/UChA (8) i sP (5) również piją znaczne ilości alkoholu. Obok genetycznych linii szczurów preferujących duże ilości alkoholu, istnieją również linie myszy, wykazujące podobną cechę, należą do nich np. myszy oznaczone symbolem linii C57BL/6 (10).

Badanie dobowego rozkładu picia alkoholu wykazało, że różnica w picciu między dwiema liniami zaznacza się najbardziej w godzinach nocnych. Spożycie alkoholu przez zwierzęta WHP jest wtedy największe, decydujące o wielkości picia dobowego.

Z porównania poziomów alkoholu we krwi u szczurów linii WHP i WLP można wnioskować, że nie różnią się one pomimo bardzo znaczących różnic w ilości wypitego alkoholu w ciągu doby. Może to sugerować, że szczury linii WHP znacznie szybciej metabolizują alkohol. Wynik ten jest zasadniczo zgodny z naszym poprzednim rezultatem, wskazującym, że po podaniu dootrzewnowym pojedynczej dawki alkoholu (2g/kg) stężenia alkoholu we krwi u zwierząt linii WHP były znacznie niższe niż w linii WLP (3). Jak dotychczas, w odniesieniu do innych linii zwierząt pijących spontanicznie alkohol nie wykazano różnic w jego metabolizmie, linia WHP może być pod tym względem wyjątkowa, konieczne są jednak dalsze badania dla wyjaśnienia tego zjawiska.

Wykazaliśmy znamienne statystyczne różnice w zespole abstynencyjnym po 14 i 36 godzinach od odstawienia alkoholu szczurom WHP i WLP. Wykazano różnice w nasileniu takich cech zespołu, jak piloerekcja, sztywność mięśniowa i wrażliwość na bodźce. Sam zespół abstynencyjny był jednak stosunkowo słaby, nie stwierdzono bowiem ani spontanicznych napadów drgawek, ani drgawek indukowanych bodźcem akustycznym (dane nieprzedstawione). Należy zauważyć, że u szczurów linii P wykazano wyraźną zależność fizyczną i zespół abstynencyjny w wyniku długotrwałego, spontanicznego picia alkoholu (11). W naszych badaniach okres spontanicznego picia był stosunkowo krótki (2 tygodnie), krótszy niż w badaniach odnoszących się do linii P, z tego względu uzyskany zespół abstynencyjny mógł być słabszy.

Picie alkoholu jest uwarunkowane najprawdopodobniej przez neurobiologiczne czynniki i ich poznanie ułatwia zrozumienie mechanizmu działania alkoholu. Wyniki wielu badań wskazują na zależność między picciem dużej ilości alkoholu a wrodzonym niedoborem serotoniny (5HT) w ośrodkowym układzie nerwowym. Wykazano, że poziom serotoniny jest 15 do 30% niższy w wielu strukturach mózgowych szczurów linii P (preferujących alkohol) w porównaniu do szczurów NP (nie preferujących alkoholu). Zmiany te stwierdzono w korze mózgowej, w jądrze półleżącym (nucleus accumbens) i w hipokampie (6, 7). Badania, które wykonaliśmy poprzednio na 11 pokoleniu linii WHP, wskazują również na redukcję stężenia 5HT i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5HIAA), głównego metabolitu 5HT w niektórych strukturach mózgu (3). Pod względem istnienia możliwości dysfunkcji układu 5HT linia WHP jest zatem podobna do innych znaczących linii wyselekcjonowanych genetycznie w kierunku fenotypu wzmożonego picia alkoholu.

Prowadzone są dalsze badania pozwalające na bliższą charakterystykę obu linii szczurów wyselekcjonowanych w naszym laboratorium.

WNIOSKI

1. Szczury grupy WHP (Warsaw High Preferring) piją duże ilości alkoholu (5 g/kg/24h i więcej) w warunkach wolnego wyboru między alkoholem a wodą.
2. Przeważająca większość szczurów grupy WLP pije małe ilości alkoholu w granicach od 0-2 g/kg/24h.
3. Poziomy alkoholu we krwi szczurów linii WHP i WLP nie różnią się pomimo dość znaczących różnic w ilości wypitego alkoholu w ciągu doby.
4. Występuje znamienna różnica w zespole abstynencyjnym szczurów WHP i WLP po 14 i 36 godzinach od odstawienia alkoholu. U szczurów linii WHP w przeciwieństwie do szczurów WLP pojawiły się takie objawy, jak piloerekcja, sztywność mięśniowa, wrażliwość na bodźce zewnętrzne.

STRESZCZENIE

Zwierzęce modele są cennym narzędziem badawczym układu nerwowego i behawioru. Stosuje się je, między innymi, w badaniach mechanizmu uzależnienia od alkoholu. W niewielu laboratoriach badawczych otrzymano genetyczne linie szczurów wykazujące dużą preferencje do alkoholu. Spośród najbardziej znanych to ALKO Alcohol/Nonalcohol (AA/ANA), Alcohol Preferring-/Nonpreferring (P/NP), HAD/LAD (High-/Low-Alcohol Drinking) i sP/SNP (Sardinian Alcohol-Preferring-/Non-preferring). Picie alkoholu przez szczury P, HAD, AA, sP jest znaczne i przewyższa 5 g/kg/24h.

W laboratorium Zakładu Farmakologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie opracowano własne linie szczurów o genetycznej preferencji do alkoholu i są to WHP (Warsaw High Preferring) (zwierzęta tej linii piją 5g/kg/24h i więcej alkoholu), druga linia WLP (Warsaw Low Preferring), szczury piją mniej niż 2 g/kg/24h alkoholu.

W pokoleniach 15, 16 i 17 obu linii badano strukturę spożycia alkoholu w ciągu doby. Wykazano w 15 pokoleniu, że tylko 4,8% zwierząt z linii WHP pije alkohol w przedziale 0-2 g/kg/24h, podczas gdy dla linii WLP wartość ta wynosi aż 57% zwierząt. Podobny rozkład ilościowy szczurów występuje w pokoleniu 16 i 17. We wszystkich trzech badanych pokoleniach, ilość zwierząt linii WLP pijących coraz większe ilości alkoholu wyraźnie maleje.

Szczury WHP piją znacznie więcej alkoholu w godzinach nocnych w porównaniu do szczurów WLP. Pomimo to stężenie alkoholu we krwi szczurów linii WHP i WLP jest podobne, co może wskazywać na różne tempo metabolizmu alkoholu w obydwu grupach zwierząt.

Badano zespół abstynencyjny u szczurów WHP i WLP po 14 i 36 godzinach od odstawienia alkoholu. U szczurów linii WHP w przeciwieństwie do szczurów WLP

pojawiły się takie objawy zespołu, jak piloerekcja, sztywność mięśniowa, wrażliwość na bodźce zewnętrzne.

Słowa kluczowe: szczury WHP i WLP, picie alkoholu, zespół abstynencyjny, poziom alkoholu we krwi.

Wanda Dyr, Paweł Krząścik, Krzysztof Dudek, Anna Witanowska, Jolanta Dzierzkowska, Wojciech Kostowski

A new line of Wistar rats selected to preference for alcohol: behavioural characteristics

SUMMARY

Animal models make a valuable tool in the research on the nervous system and behaviour. They are used also to study the mechanism of alcohol dependence. In few laboratories only genetic rat lines manifesting marked preference for alcohol have been bred. Among the best known are the following ones: ALKO Alcohol/Nonalcohol (AA/NA), Alcohol Preferring/-Nonpreferring (P/NP), HAD/LAD (High-/Low-Alcohol Drinking), and sP/SNP (Sardinian Alcohol-Preferring/-Nonpreferring. Alcohol intake in P, HAD, AA and sP rats is considerable, amounting to over 5g/kg/24h.

In the laboratory of the Pharmacology Department, Institute of Psychiatry and Neurology in Warsaw two rat lines with genetic preference for alcohol have been bred: WHP (Warsaw High Preferring) and WLP (Warsaw Low Preferring). The former drink 5g/kg/24h or more alcohol while the latter drink less than 2g/kg/24h.

Alcohol consumption patterns per 24h were studied in the 15th, 16th and 17th generations of both these rat lines. In the 15th generation only 4.8% of WHP rats were found to drink alcohol in the 0 to 2g/kg/24h range, while in the WLP line as many as 57% of animals had alcohol intake in this range. A similar distribution was observed in generations 16th and 17th. In all the three generations the number of WLP rats with an increasing alcohol intake is obviously declining.

WHP rats as compared to WLP rats drink much more alcohol in nocturnal hours. However, blood alcohol level in the WHP and WLP lines turned out to be similar, which may indicate a different rate of alcohol metabolism in the two groups of animals.

WHP and WLP rats were assessed for the withdrawal syndrome after 14 and 36 hours of abstinence from alcohol. Such symptoms as piloerection, muscular rigidity, and sensitivity to external stimuli occurred in the WHP rats, but not in the WLP line animals.

Key words: WHP and WLP rats, alcohol drinking, withdrawal syndrome, blood alcohol level

PIŚMIENNICTWO

1. Bisaga A., Kostowski W. *Selective breeding of rats differing in voluntary ethanoconsumption*. Pol. J. Pharmacol. 1993, 45, 431-436.

2. Cicero T.J. *A critique of animal analogues of alcoholism*, in *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*, Vol. 2, Majchrowicz, E. and Noble, E.P. Eds. Plenum Press, New York, 1979, 533-560.
3. Dyr W., Dzierzkowska J., Iwińska K., Krząścik P., Witanowska A., Kostowski W. *Preliminary biochemical and behavioral analysis of the new line of rats selectively bred for high ethanol consumption*. *Alcohol and Alcoholism*, 1997, 32, 3, 479.
4. Eriksson K. *Genetic selection for voluntary ethanol consumption in the albino rat*. *Science* 1968, 159, 739-741.
5. Fadda F., Mosca E., Colombo G., Gessa G.L. *Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism*. *Life Sci.* 1989, 44, 281-287.
6. Li T.-K., Lumeng L., McBride W.J., Waller M. B., Hawkins D.T. *Progress towards a voluntary oral-consumption model of alcoholism*. *Drugs Alcohol Depend.* 1979, 4, 45-60.
7. Lumeng L., Li T.-K. *The development of metabolic tolerance in the alcohol preferring P rats: comparison of forced and free-choice drinking of ethanol*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986, 25, 1013-1020.
8. Mardones J., Segovia-Riquelme N. *Thirty-two years of selection of rats for ethanol preference: UChA and UChB strains*. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983, 5, 171-178.
9. Piet N.W. (ed.) *Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunder Co., Philadelphia USA., 1986, str. 1706
10. Roger D.A., McClearn G.E. *Mouse strain differences in preferences for various concentrations of alcohol*. *Alcohol*, 1962, 23, 26-33.
11. Waller M.B., McBride W.J., Lumeng L., Li T.-K. *Induction of dependence on ethanol by free-choice drinking in alcohol-preferring rats*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1982, 16, 501-507.