

WYSELEKCJONOWANE LINIE WHP I WLP SZCZURÓW LABORATORYJNYCH: UTRWALONE RÓŻNICE FENOTYPU W ZAKRESIE WIELKOŚCI SPOŻYCIA ALKOHOLU

Wanda Dyr¹, Wojciech Kostowski^{1,2}

¹Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego
Instytutu Psychiatrii i Neurologii

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

WSTĘP

W badaniach nad procesami uzależnienia od alkoholu, laboratoryjne modele zwierzęce są pomocnym narzędziem badawczym. Szczególne znaczenie mają genetycznie linie szczurów wyselekcjonowane w kierunku pożądanego fenotypu. W wyniku selektywnej hodowli i doboru zwierząt uzyskano dotychczas kilka linii szczurów wywodzących się najczęściej ze szczepu Wistar, pijących w warunkach wolnego wyboru nadmierne ilości alkoholu. Jednocześnie wyhodowano linie zwierząt selekcjonowanych w kierunku zmniejszonego picia i zmniejszonej preferencji alkoholu. Do najbardziej znanych linii wyselekcjonowanych w tych kierunkach należą: linia AA/ANA (ALKO alcohol/nonalcohol) (5,9), P/NP (Alcohol Preferring-Nonpreferring) (12, 13, 14), HAD/LAD (High/Low-Alcohol Drinking) (13), sP/sNP (sardinian Alcohol-Preferring/-Nonpreferring) (6). Picie alkoholu przez zwierzęta linii wysoko preferujących przewyższa 5g/kg/24godz, co stanowi ogólnie przyjęte kryterium kwalifikacji do tych linii.

Trwające od kilku lat prace w naszym laboratorium doprowadziły do uzyskania 23-24 pokolenia linii (WHP – Warsaw High Preferring) szczurów pijących spontanicznie duże ilości alkoholu (≥ 5 g/kg/24godz.) w warunkach wolnego wyboru („w teście 2 butelek”), między wodą a 10% roztworem etanolu. Równoległą „partnerską” linią do WHP są szczury niepreferujące lub bardzo słabo preferujące alkohol-WLP (Warsaw Low Preferring). Zwierzęta linii WLP piją spontanicznie niewielkie ilości alkoholu (≤ 2 g/kg/24godz.) jeśli poddane są podobnej procedurze jak linia WHP (1-4). Badania przedstawione w tej pracy obejmowały pokolenia F₂₀₋₂₁. Zwierzęta linii WLP piły średnio około 0,5 g/kg/24godz. etanolu w warunkach wolnego wyboru między 10% roztworem alkoholu a wodą. Z danych z piśmiennictwa wynika, że w określonych warunkach zwierzęta linii mało preferujące zaczynają spożywać większe ilości alkoholu.

Istotny wpływ na picie alkoholu wywiera smak, ponieważ sygnały smakowe reprezentują istotny element pokarmowy (7), a sama percepcja smaku pełni także funkcje ochronne dla organizmu. Smak alkoholu może odgrywać ważną rolę w podjęciu decyzji odnośnie do spożywania i możliwości doprowadzenia do uzależnienia. Badając reaktywność smakową na alkohol u szczurów, analizuje się szczegółowo reakcje na jego podanie bezpośrednio do jamy ustnej. Generalnie, reakcje na podanie alkoholu są kategoryzowane jako pokarmowe (ruchy języka i warg, które ułatwiają przyjęcie pokarmu) lub awersyjne (różnorodne ruchy warg, języka i ciała, które pozwalają zwierzęciu odrzucić i usunąć substancję (7, 8). Można zaobserwować, że w miarę stopniowego zwiększania stężenia roztworu etanolu

np. od 5% do 40% liczba ruchów charakterystycznych dla spożywania pokarmu zwiększa się, co może oznaczać, że zwierzęta zaczynają akceptować coraz większe stężenia alkoholu.

W niniejszym badaniu postanowiono zatem sprawdzić, czy ekspozycja szczurów linii WLP na stopniowo wzrastające stężenie (2-10%) roztworu alkoholu (a nie tak jak dotychczas prezentowane od razu stężenie 10% vs woda) może zmienić profil ich picia. Podobnej procedurze badawczej poddano zwierzęta linii WHP oraz nieselekcjonowane szczury Wistar.

METODY

Do badania użyto szczury linii WHP i WLP, które w celu dokonania selekcji przez pierwszy tydzień piły tylko 10% roztwór alkoholu. Alkohol był podawany w dwóch specjalnie skonstruowanych skalowanych poidelkach przymocowanych do ściany klatki.

W drugim i trzecim tygodniu szczurom podawano w jednym poidelku wodę a w drugim 10% roztwór etanolu, aby w ten sposób umożliwić im swobodny wybór picia. W czwartym tygodniu mierzono w ml ilość wypijanego 10% roztworu etanolu. Ilość spożytego w ml 10% roztworu etanolu została przeliczona na g/kg/24godz. czystego etanolu. Szczury z linii WHP pijące więcej niż 5g/kg/24godz. i szczury z linii WLP pijące mniej niż 2g/kg/24godz. etanolu zostały zakwalifikowane do badań.

Grupę kontrolną stanowiły nieselekcjonowane szczury Wistar.

Każda badana grupa składała się z 8-10 zwierząt, które przebywały w pojedynczych klatkach, w standardowych warunkach laboratoryjnych (temperatura 22°C) mając nieograniczony dostęp do granulowanego pokarmu.

Ponieważ celem badania było określenie pojawiających się zmian przy ekspozycji szczurów linii WLP na stopniowo wzrastające stężenie (2-10%) roztworu alkoholu (a nie tak jak dotychczas prezentowane od razu stężenie 10% vs woda), zwierzętom przez szereg tygodni podawano zwiększające się stężenia alkoholu. Podobnej procedurze badawczej poddano zwierzęta linii WHP oraz nieselekcjonowane szczury Wistar.

Stąd też w pierwszym tygodniu testu szczurom wszystkich badanych grup podawano 2% roztwór etanolu i wodę, a w następnych tygodniach zwiększano co tydzień stężenie roztworu etanolu o 1% tak, że w końcowej fazie badania (tj. w 9 tygodniu) stężenie etanolu wynosiło 10%. Obliczano średnie spożycie etanolu i pokarmu (g/kg/24godz.) przy dostępie do poszczególnych stężeń roztworów etanolu.

W drugiej części doświadczenia, w oddzielnych grupach szczurów linii WHP, WLP i nieselekcjonowane Wistar testowano przez 9 tygodni ciągłą ekspozycję na 10% roztwór etanolu i wodę. Podobnie jak w pierwszej serii badań, obliczano średnie spożycie etanolu i pokarmu (g/kg/24godz.) w każdym tygodniu trwania eksperymentu.

Do obliczenia różnicy statystycznej zastosowano analizę ANOVA jednoczynnikową i test post-hoc Newman-Keuls.

WYNIKI

W warunkach dostępu wyłącznie do 10% roztworu alkoholu i wody, wszystkie zwierzęta linii WLP wykazują profil picia charakteryzujący się bardzo małym spożyciem alkoholu (0-2 g/kg/24godz. czystego etanolu). Przy zastosowaniu procedury dostępu do stopniowo wzrastających stężeń alkoholu (o 1% w ciągu tygodnia poczynając od 2% a kończąc na 10% roztworze alkoholu), pojedyncze szczury z linii WLP wykazywały znaczne zwiększenie picia alkoholu (od 2-4 i więcej g/kg/24godz. etanolu). Dotyczyło to nie więcej niż 25% zwierząt WLP (tabela 1).

W przeciwieństwie do linii WLP, w pozostałych grupach zwierząt procedura stopniowego dostępu do wzrastających stężeń alkoholu przyniosła odmienne rezultaty. W grupie szczurów nieselekcjonowanych Wistar wykazano, że począwszy od 5 tygodnia doświadczenia ponad 50% szczurów w badanej grupie piło więcej niż 4 g/kg/24godz. etanolu (tabela 2), a w grupie szczurów WHP liczba ta była jeszcze większa i wahała się w granicach 75-100% (tabela 3).

TABELA 1
Procent szczurów WLP pijących określone ilości etanolu w g/kg/24godz.
przy dostępności wzrastających stężeń alkoholu.

EtOH g/kg/24godz.	Roztwór etanolu								
	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
0-2	100	100	75	75	62,5	75	62,5	87,5	75
2-4	0	0	25	12,5	25	25	25	12,5	25
>4	0	0	0	12,5	12,5	0	12,5	0	0

TABELA 2
Procent szczurów nieselekcjonowanych WISTAR pijących określone ilości etanolu
w g/kg/24godz. przy dostępności wzrastających stężeń alkoholu.

EtOH g/kg/24godz.	Roztwór etanolu								
	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
0-2	60	40	10	30	10	20	20	30	50
2-4	40	60	70	30	20	20	30	20	40
>4	0	0	20	40	70	60	50	50	10

TABELA 3
Procent szczurów WHP pijących określone ilości etanolu
w g/kg/24godz. przy dostępności wzrastających stężeń alkoholu.

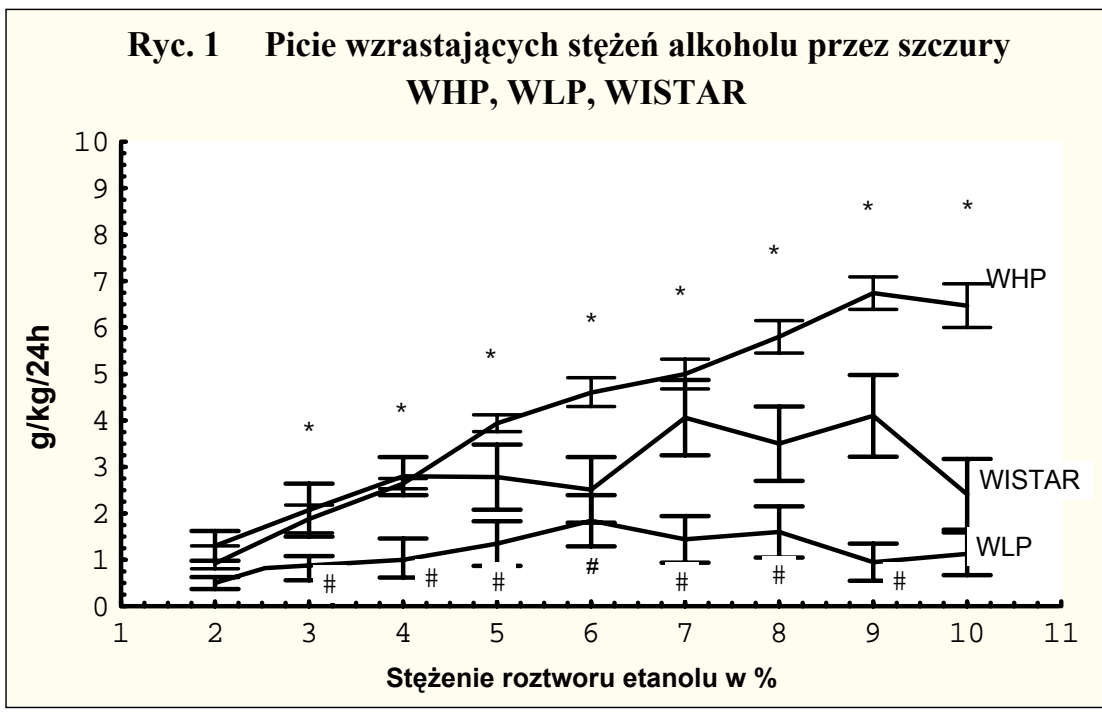
EtOH g/kg/24godz.	Roztwór etanolu								
	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
0-2	100	62,5	0	0	0	0	0	0	0
2-4	0	37,5	100	37,5	25	0	0	0	12,5
>4	0	0	0	62,5	75	100	100	100	87,5

Ponadto stwierdzono, że generalnie przy dostępności poszczególnych, wzrastających stężeń alkoholu średnie spożycie etanolu przez nieselekcjonowane szczury Wistar było, zwłaszcza w dalszych tygodniach testu, ponad dwukrotnie większe w porównaniu do zwierząt linii WLP. Przy dostępie do roztworów alkoholu o stężeniach od 2-10% jego spożycie przez szczury z linii WLP było małe i nie przekraczało 2g/kg/24godz., natomiast szczury z grupy WHP w miarę zwiększających się stężeń roztworów alkoholu spożywały go w coraz większych ilościach osiągając 5g/kg/24godz. i więcej (ryc. 1).

Średnie spożycie pokarmu przez szczury WLP i WHP w ciągu doby nie różniło się między sobą przy picciu różnych stężeń alkoholu, ale szczury nieselekcjonowane Wistar spożywały znacznie więcej pokarmu niż szczury WLP i WHP, jak również wielkość jego spożycia była zależna od określonego stężenia roztworu alkoholu i zmniejszała się w miarę trwania eksperymentu (ryc. 2).

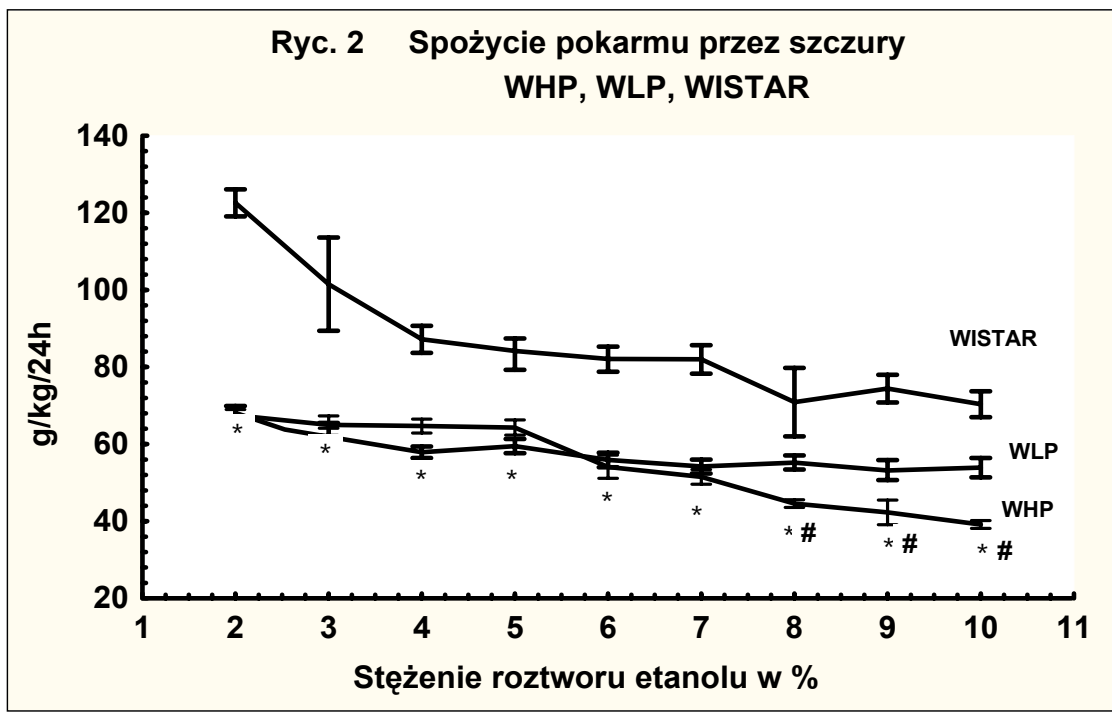
W kolejnym eksperymencie, w którym wszystkie trzy grupy szczurów (WLP, WHP i nieselekcjonowane Wistar) otrzymywały 10% roztwór alkoholu i wodę do spontanicznego picia przez 9 tygodni, wykazano również charakterystyczne różnice między poszczególnymi grupami. Analiza statystyczna wykazała, że szczury z grupy WHP poczynając od pierwszego tygodnia picia 10% roztworu alkoholu spożywają alkohol w ilościach przekraczających 5g/kg/24godz. i wielkość ta utrzymywała się przez cały okres badania (9 tygodni).

Zwierzęta z grupy WLP, wykazywały natomiast utrwalony typ małej preferencji, nie przekraczając dobowego spożycia etanolu powyżej 2g/kg/24godz.. Z kolei, szczury nieselekcjonowane spożywały alkohol w ilościach „pośrednich” tj. mniejszych niż grupa WHP, aczkolwiek w powoli wzrastających



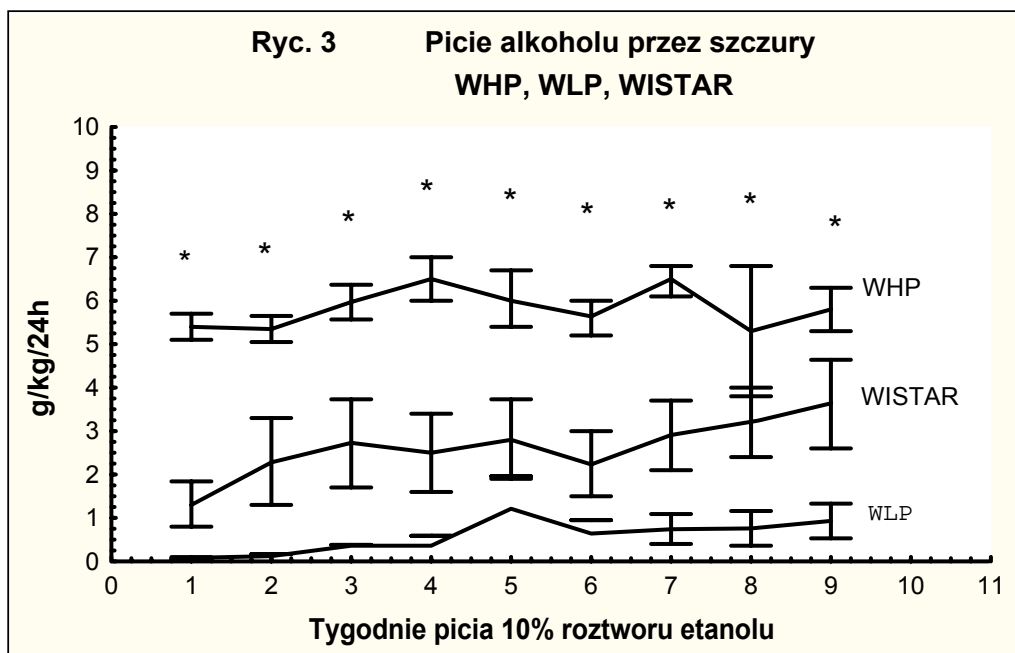
Ryc. 1. Średnie wartości picia etanolu±SEM w g/kg/24godz. przez szczury WHP, WLP i nieselekcjonowane Wistar w procedurze wzrastających stężeń roztworów etanolu.

* $p < 0.05$ vs WLP; # $p < 0.05$ vs Wistar.



Ryc. 2. Średnie wartości spożycia pokarmu±SEM w g/kg/24godz. przez szczury WHP, WLP i nieselekcjonowane Wistar w procedurze wzrastających stężeń roztworów etanolu.

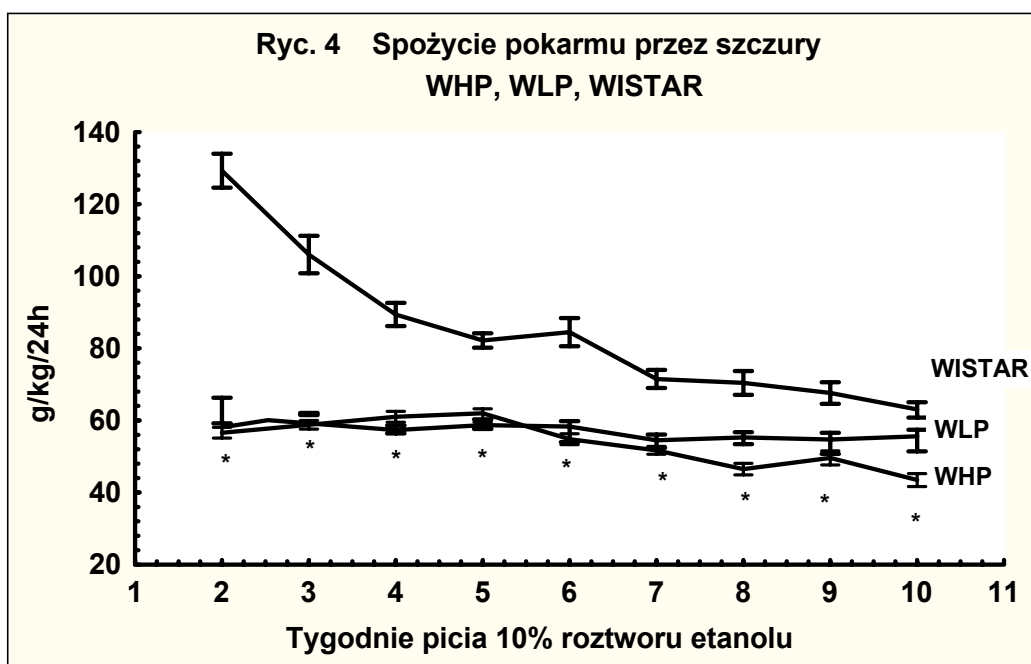
* $p < 0.05$ vs Wistar; *# $p < 0.05$ vs Wistar i WLP.



Ryc. 3. Średnie wartości picia etanolu±SEM w g/kg/24godz. przez szczury WHP, WLP i nieselekcjonowane Wistar przy stałej dostępności 10% roztworu etanolu.

* $p < 0.05$ vs WLP.

ilościach w kolejnych tygodniach eksperymentu (ryc. 3). Spożycie pokarmu, podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, było większe u zwierząt nieselekcjonowanych niż w grupach WHP i WLP (ryc. 4).



Ryc. 4. Średnie wartości spożycia pokarmu±SEM w g/kg/24godz. przez szczury WHP, WLP i nieselekcjonowane Wistar przy stałej dostępności 10% roztworu etanolu.

* $p < 0.05$ vs Wistar.

DYSKUSJA

Wyniki naszych badań wskazują, że szczury linii WHP i WLP różnią się istotnie pod względem wielkości spożycia alkoholu i że różnica ta utrzymuje się w zasadzie niezależnie od zastosowanej procedury inicjowania picia w warunkach wolnego wyboru między wodą a roztworem alkoholu. W wersji „sztynnej”, w której od samego początku zwierzęta miały do wyboru 10% roztwór alkoholu i wodę, szczury WHP już w pierwszym tygodniu zaczynały spożywać duże ilości alkoholu (4 g/kg/24/h i więcej) i spożycie to utrzymywało się w zasadzie niezmiennie przez cały czas trwania doświadczenia (9 tygodni). Zwierzęta linii WLP, poddane tej procedurze w pierwszych tygodniach, nie piły niemal w ogóle alkoholu, a w następnych średnia ilość pitego alkoholu wahała się w granicach 0-2 g/kg/24godz.. Wykazywały zatem bardzo małe wartości spożycia alkoholu nie tylko wobec linii WHP, lecz także w porównaniu z nieselekcjonowanymi szczurami Wistar. Szczury Wistar poddane tej procedurze spożywały znacznie mniej alkoholu niż szczury WHP, lecz wyraźnie przekraczały wielkości picia u zwierząt linii WLP.

W warunkach dostępu do stopniowo zwiększających się stężeń alkoholu, szczury WLP również piły najmniej alkoholu, jakkolwiek począwszy od 3 tygodnia ilość ta zwiększała się i w tygodniach 4-7 (stężenia alkoholu 5-8%) ponad 1/3 zwierząt spożywała alkohol w ilości 2-4 g/kg/24godz. Zwraca przy tym uwagę fakt, że wielkości picia alkoholu >4 g/kg/24godz. nie przekraczało więcej niż 1/8 zwierząt (12,5%) i nie dotyczyło to stężeń największych (9-10%) dostępnych w 8 i 9 tygodniu badania. Nasuwa to przypuszczenie, że awersyjne odczucie smaku alkoholu może odgrywać istotną rolę w różnicowaniu się obu fenotypów WLP i WHP (problem ten będzie omówiony dalej). Również i ta procedura wyraźnie różnicowała zwierzęta WLP nie tylko od linii WHP, które począwszy od 4 tygodnia piły największe (> 4 g/kg/24 godz.) ilości alkoholu (uzyskanie takiej wartości wcześniej ograniczała objętość płynu, które musiałyby wypić), lecz także od nieselekcjonowanych zwierząt Wistar. Zwraca uwagę, że przy zastosowaniu tej procedury grupa ta osiągała znaczne wielkości picia i począwszy od 2. tygodnia ponad 50% szczurów spożywało ponad 2g/kg/24godz. i aż 50-70% dochodziło do wartości 4 g/kg/24/godz. i większych, czyli spełniało kryteria szczurów „wysokopreferujących”. Jednak i w tej grupie, awersyjność stężenia 10% okazała się największa.

Uzyskane wyniki wykazały, że fenotypy nadmiernego spożycia alkoholu (linia WHP) i spożycia najmniejszego (linia WLP) są dobrze utrwalone w pokoleniach F₂₃₋₂₄. Ekspozycja na roztwór alkoholu o znacznym stężeniu (10%) różnicuje oba fenotypy w sposób najbardziej wyraźny. Efekt procedury rozpoczynającej się od stężeń małych (2%) i stopniowo zwiększanych, jakkolwiek nasilił spożycie alkoholu w grupie WLP, okazał się jednak dla tej grupy znacznie mniejszy niż dla zwierząt nieselekcjonowanych. Unikanie alkoholu przez szczury WLP może wynikać z wielu przyczyn. Jedną z nich może być silniejsza awersja smaku alkoholu i słabszy rozwój tolerancji na nią. Przemawiają za tym omówione powyżej rezultaty obu zastosowanych procedur badawczych, w których ujawniła się awersyjność na większe stężenia alkoholu. Zastosowanie procedury stopniowanego zwiększania stężenia alkoholu doprowadziło do pewnego przełamania awersji i rozwoju tolerancji, za czym przemawia zwiększenie picia, jednak efekt tej procedury był, jak wspomniano wyżej, słabszy niż u zwierząt nieselekcjonowanych. Z badań prowadzonych poprzednio w naszym laboratorium (10) wynika, że małe stężenia alkoholu (2-4%) mogą wykazywać podobieństwo do smaku słodkiego (a więc smakowo bardzo atrakcyjnego) ponieważ wielkość picia roztworów sacharozy okazała się być dodatnio skorelowana z badanym, w następnej kolejności, piciem mało stężonych (lecz nie silniejszych) roztworów alkoholu.

Nasze wcześniejsze badania na liniach WHP i WLP (pokolenie F₁₆₋₁₇) wykazały, że szczury WHP preferują silniejsze roztwory o smaku słodkim (sacharoza, sacharyna) i lepiej tolerują nawet bardzo stężone roztwory słodkie (30% roztwór sacharozy), które są awersyjne dla szczurów WLP (3).

Nasze wyniki, wskazujące na różnice w pokarmowej atrakcyjności roztworów alkoholu dla szczurów obu selekcjonowanych linii, są zgodne z badaniami prowadzonymi na znanych liniach Alco alcohol (AA, linia preferująca alkohol) i Alco nonalcohol (ANA, linia mało preferująca alkohol) (8). Wykazano w nich, że szczury AA reagują silniej niż szczury ANA odruchowymi czynnościami pokarmowymi warg i języka

na różne (nawet wysokie, 10-40%) stężenia roztworów alkoholu. Były zatem bardziej odporne na awersyjne właściwości smakowe alkoholu i to w sposób selektywny, bowiem nie dotyczyło to awersyjności np. na gorzki smak chininy.

Selekcja fenotypów nadmiernego i małego spożycia alkoholu może zatem w znacznym stopniu wynikać z utrwalania odmiennej reaktywności na jego awersyjne cechy smakowe. Czy mają one znaczenie dla rozwoju uzależnienia – trudno określić jednoznacznie, a wiele wyników raczej przeczy takiemu powiązaniu. Na przykład wykazano, że nawet długotrwały uprzedni kontakt z alkoholem nie przyspiesza procesu instrumentalnego samopodawania alkoholu u szczurów (12).

Mechanizmy neuroprzekątnikowe leżące u podstaw nadmiernego i małego spożycia alkoholu są przedmiotem wielu badań, pozostają jednak wciąż słabo poznane. U znanych linii, np. amerykańskiej preferującej alkohol linii P (preferring) stwierdzono zmniejszenie stężenia serotoniny i jej metabolitu, kwasu 5-hydroksyindoloctowego (5-HIAA) w mózgu (15), co wskazuje na osłabienie neuroprzekątnictwa serotonergicznego. Z cechą tą dość powszechnie wiąże się preferencja alkoholu (15). Nasze poprzednie badania, prowadzone na pokoleniach F₁₂₋₁₃, wykazały również podobne cechy linii WHP (4), lecz nie wykryto ich w dalszych pokoleniach F₁₉₋₂₀, które z kolei ujawniły obniżenie poziomu dopaminy w niektórych obszarach mózgu. Problem ten pozostaje zatem nadal otwarty i wymaga dalszej analizy.

PODSUMOWANIE

Wyniki doświadczenia wskazują na utrwalonego fenotyp małego picia alkoholu przez szczury linii WLP w pokoleniu F₂₃₋₂₄. Unikanie alkoholu może być związane z jego większą awersyjnością (być może smakową). Z kolei linia WHP wykazuje utrwaloną cechę nadmiernego picia. Obie linie różnią się znamienne od nieselekcjonowanych szczurów Wistar, u których picie alkoholu (w obu stosowanych procedurach) kształtuje się w granicach wielkości pośrednich między liniami WHP i WLP.

STRESZCZENIE

Spośród laboratoryjnych modeli uzależnień od substancji psychoaktywnych, ważne znaczenie mają genetycznie wyselekcjonowane linie szczurów o utrwalonym fenotypie dużej preferencji alkoholu etylowego. W naszym laboratorium jest prowadzona od kilku lat selekcja szczurów Wistar, której wynikiem jest wyhodowanie dwóch linii – WHP (Warsaw High Preferring) i WLP (Warsaw Low Preferring), pijących w warunkach wolnego wyboru z wodą – odpowiednio nadmierne i niewielkie ilości alkoholu etylowego. Obecnie dysponujemy 23-24 pokoleniem zwierząt obu linii. W celu dokonania selekcji, szczury przez jeden tydzień miały do dyspozycji wyłącznie 10% alkohol, następnie przez 3 tygodnie roztwór alkoholu do wyboru z wodą (test 2 butelek). Podczas tego badania określano wielkość dobrowolnego picia, przy czym za kryterium dużej preferencji do picia alkoholu uznawano spożycie przynajmniej 5.0 g/kg/24godz. (w przeliczeniu na czysty alkohol). Zwierzęta spożywające mniej niż 2g/kg/24godz. spełniały kryterium małej preferencji do alkoholu. W przedstawionych obecnie badaniach porównywano picie alkoholu przez szczury linii WHP i linii WLP w dwóch sytuacjach eksperymentalnych. W modelu pierwszym, zwierzęta od samego początku miały do wyboru 10% roztwór etanolu i wodę przez kolejnych 9 tygodni. W modelu drugim, zwierzęta miały dostęp do stopniowo wzrastających (o 1% tygodniowo) stężeń etanolu zaczynając od roztworu 2% w pierwszym tygodniu doświadczenia i kończąc na roztworze 10% w 9 tygodniu. Wyniki badania wykazały, że pomimo zastosowania procedury łagodnego stopniowania dostępnych stężeń alkoholu, szczury linii nisko preferującej (WLP) utrzymywały niski poziom spożycia alkoholu na niemal podobnym poziomie, jak podczas stosowania procedury pierwszej (czyli „sztywnego” dostępu do 10% roztworu etanolu). Szczury linii WLP spożywały bardzo małe ilości alkoholu nie tylko w porównaniu z linią WHP, lecz także z grupą kontrolną szczurów nieselekcjonowanych Wistar. Wynika z tego, że fenotyp małego i intensywnego picia etanolu u obu linii jest utrwalony i utrzymuje się na stałym poziomie, niezależnie od stosowanej

procedury doświadczalnej. Mała preferencja alkoholu u zwierząt WLP wynikać może z większej awersyjności smakowej alkoholu.

Słowa kluczowe: preferencja alkoholu, linia WHP, linia WLP szczury, etanol.

PIŚMIENNICTWO

1. Bisaga A., Kostowski W.: *Selective breeding of rats differing in voluntary ethanol consumption*. Pol. J. Pharmacol. 1993, 45, 431- 436.
2. Dyr W., Krząścik P., Dudek K., Witanowska A., Dzierzkowska J., Kostowski W.: *Nowa linia szczurów Wistar selekcyjonowanych w kierunku nadmiernej preferencji alkoholu: charakterystyka behavioralna*. Alkoholizm i Narkomania 1999. nr 4(39).
3. Dyr W., Kostowski W.: *Animal model of ethanol abuse: Rats selectively bred for high and low voluntary alcohol intake*. Acta Pol. Pharmac. 2000, 57, supl. 90-92.
4. 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, 479.
5. Eriksson K.: *Genetic selection for voluntary ethanol consumption in the albino rat*. Science. 1968, 159, 739-741.
6. 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.
7. Grill H. J.: *Introduction: Physiological mechanisms in conditioned taste aversion*. NY Acad. Sci. 1985, 443, 67-88.
8. Kiefer S. W.: *Alcohol, palatability, and taste reactivity*. Neurosci. Biobehav. Rev. 1999, 19, 133-141.
9. Kiiianmaa K., Stenius K., Sinclair J. D.: *Determinants of alcohol preference in the AA and ANA rats lines selected for differential ethanol intake*. Alcohol, 1991, supl. 115-120.
10. Koroś E., Piasecki J., Kostowski W., Bienkowski P.: *Saccharin drinking rather than open field behavior predicts initial ethanol acceptance in Wistar rats*. Alcohol Alcohol. 1998, 33, 131-140.
11. Koroś E., Kostowski W., Bienkowski P.: *Operant responding for ethanol in rats with a long-term history of free-choice ethanol drinking*. Alcohol Alcohol. 1999, 34, 685-689.
12. Li T.-K., Lumeng L., McBride W.J., Waller M.B., Hawkins D. T.: *Progress towards a voluntary oral-consumption model of alcoholism*. Drug Alc. Depend. 1979, 4, 45-60.
13. Li T.-K., Lumeng L., McBride W. J., Murphy J. M.: *Rodent lines selected for factors affecting alcohol consumption*. Alcohol Alcohol. 1987, supl. 1, 91-96.
14. Li T.-K., Lumeng L., McBride W. J., Murphy J. M.: *Genetic and neurobiological basis of alcohol-seeking behavior*. Alcohol Alcohol. 1994, 29, 697-700.
15. Sellers E. M., Higgins G. A., Sobell M. B.: *5-HT and alcohol abuse*. Trends in Pharmacol. Sci. 1992, 12, 69-75.