

Discussion

Objektyp: **Group**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **20 (1964)**

PDF erstellt am: **17.07.2024**

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

DISCUSSION

H. Isliker (Lausanne): Mécanismes de cytolyse

De nombreuses expériences ont démontré qu'un organisme sain est capable d'éliminer des implants de cellules cancéreuses vivantes. La défense naturelle d'un être vivant est due à des facteurs cellulaires et humoraux. Pour agir, ces derniers doivent reconnaître les cellules cancéreuses comme telles par l'intermédiaire d'anticorps « naturels », ou acquis au contact de cellules étrangères. Les anticorps naturels sont en général du type 19 S et sont dirigés contre une configuration commune à de nombreux antigènes d'origine bactérienne ou animale. Grâce au phénomène de la tolérance immunologique, seuls subsistent les anticorps dirigés contre des cellules étrangères ou altérées. Certains auteurs ont réuni l'ensemble de ces anticorps naturels sous le terme de properdine. Leur taux peut être fortement accru par l'injection d'endotoxines et il s'est

Tableau I
Taux d'anticorps 19 S du type de la properdine* après l'inoculation de sarcomes de Walker à des rats [1]

rat No	jours après l'inoculation				
	0	5	8	13	18
1	42	10	11	10	2
2	26	14	6	6	2
3	20	21	6	5	3
4	10	2	3	—	1
5	10	1	2	2	2

* mesuré selon la technique de Linder et Isliker [3].

Tableau II
Extraction d'anticorps 19 S à partir de la partie nécrosée d'un sarcome de Walker

rat No	anticorps 19 S extraits de 100 mg de tumeur*
1	15
2	83
3	21
4	6
5	30
6	73
7	9
8	31
moyenne des expériences 1 à 8	32
moyenne des expériences de contrôle	<4

* extraits à une force ionique de 0,6, pH 7,5, 37°C, et mesurés selon la technique de Linder et Isliker [3].

avéré que des animaux ainsi traités présentent également un pouvoir élevé d'éliminer des implants de cellules cancéreuses.

L'effet des endotoxines sur la défense naturelle d'un organisme est de nature complexe. Des doses élevées bloquent le système réticulo-endothélial, de petites doses, au contraire, le stimulent. Elles agissent sur les éléments cellulaires tels que les microphages et les macrophages, ainsi que sur la glycolyse aérobie et la plupart des hydrolases intracellulaires; elles augmentent également certains facteurs humoraux, tels que le système fibrinolytique, le lysozyme, les plaquines et les anticorps 19 S du type de la properdine.

La plupart des facteurs sériques de la défense naturelle se voient fortement abaissés chez les cancéreux. Le tableau I montre que le taux d'anticorps du type de la properdine diminue après l'inoculation de sarcomes de Walker à des rats [1]. Il s'est avéré que ces anticorps se fixent au tissu tumoral, dont ils peuvent être libérés par des procédés spéciaux (force ionique 0,6, pH 7,5, 37°C). Le tableau II indique que des quantités appréciables d'anticorps 19 S peuvent être éluées des tumeurs par des solutions de force ionique élevée, alors que des quantités minimales d'anticorps sont extraites à partir d'organes de contrôle dans les mêmes conditions [2,4]. Une analyse plus approfondie a démontré que ce sont surtout les parties nécrosées de la tumeur qui fixent les anticorps du type de la properdine et sont ainsi responsables de l'abaissement de leur taux dans le sang (tableau III) [4].

Le taux des β_{2M} -globulines a été mesuré par une méthode immunologique chez 28 malades atteints de cancer [5]. Dans 4 cas qui présentaient une élévation marquée des α_2 -globulines (dégradation tissulaire, nécrose), les β_{2M} -globulines étaient abaissées à la moitié, voire au quart du taux normal. Il est concevable que cet abaissement est dû à une fixation des anticorps naturels du type de la properdine sur le tissu nécrosé de la tumeur. Des résultats semblables avaient été obtenus dans des cas de tuberculose exsudative avancée, où l'on avait constaté une masse importante de tissus nécrosés [6].

La fixation des anticorps naturels sur des cellules âgées ou pathologiquement altérées est un phénomène général, et peut être considérée comme un mécanisme déclenchant l'élimination d'une cellule indésirable par l'intermédiaire des composés du complément. L'activation de ces derniers donne naissance à des substances lysant surtout les lipoprotéines de la membrane. Ce n'est qu'ensuite qu'interviennent d'autres facteurs humoraux tels que le lysozyme, qui lui agit sur les parties polysidiques de la membrane cellulaire. Pour que la cytolysse ait lieu, il faut que les enzymes agissent de façon coordonnée:

Tableau III
Extraction d'anticorps 19 S à partir d'un sarcome

rat No	anticorps 19 S* extraits de 100 mg de tumeur	
	partie nécrosée	partie non nécrosée
1	15	<3
2	121	<5
3	157	11
4	363	48
moyenne	164	<17
moyenne des contrôles	-	<4

* extraits à une force ionique de 0,6, pH 7,5, 37°C, et mesurés selon la technique de Linder et Isliker [3].

en effet il importe de dépouiller la cellule des couches lipoprotéiques et glucidiques superposées constituant sa membrane.

Afin de comprendre le phénomène de la cytolyse, il convient donc d'étudier les mécanismes de défense dans leur ensemble. Ceux-ci semblent être particulièrement aptes à la destruction de cellules cancéreuses libres.

1. *Wili B., Flückiger H., Gloor-Schindler M. L. et Isliker H.*: non publié. – 2. *Isliker H.*: Immunopathology, 1st International Symposium, Basel/Seelisberg 1958, p. 20–40. – 3. *Linder E. et Isliker H.*: Vox sanguinis 3/1, 23 (1958). – 4. *Gloor-Schindler M. L.*: Thèse 1963, Université de Berne. – 5. *Micheli A., Jeunet F., Clément F. et Isliker H.*: non publié. – 6. *Barandun S. et Isliker H.*: Helv. medica Acta 26, 791 (1959).

E. F. Lüscher (Bern): Plasmaproteasen als cytotoxische Cofaktoren

Das menschliche Blutplasma enthält eine beträchtliche Zahl proteolytischer Aktivitäten, die nur zum Teil näher charakterisiert sind. Dies hängt vor allem damit zusammen, daß viele dieser Proteasen nur ein wohldefiniertes Substrat hochspezifisch anzugreifen vermögen. Zur Illustration sei auf die verschiedenen Aktivierungssequenzen von Fermentsystemen verwiesen, die ganz oder teilweise aus eiweißspaltenden Fermenten aufgebaut sind. Solche Systeme sind beispielsweise Blutgerinnung und Fibrinolyse sowie das Komplementsystem und die Kallikrein-Aktivierungskette. In vielen Fällen sind die Substrate dieser spezifischen Proteasen nur schlecht charakterisiert oder überhaupt unbekannt, so daß auf das Vorliegen eines bestimmten Fermentes oft nur gestützt auf das Endprodukt der ganzen Reaktionskette geschlossen werden kann. In neuerer Zeit ist durch die Einführung synthetischer Substrate, insbesondere die Ester gewisser Aminosäuren, ein Weg eröffnet worden, der dieses Spezifitätsproblem zu umgehen gestattet.

Die Euglobuline aus menschlichem Serum lassen sich z. B. durch Chromatographie in 6 bis 7 Hauptfraktionen auftrennen. Werden diese Fraktionen weiterhin durch Elektrophorese in Stärkegel unterteilt, so läßt sich abschätzen, daß schon mit einfachen Testmethoden mindestens 6 bis 8 verschiedene Fermente, die sich durch Aminosäure-ester-Spaltung manifestieren, erfaßt werden [1]. Auch das Überstehende der Euglobulinfällung erweist sich als aktiv und des weiteren besteht guter Grund zur Annahme, daß die verwendeten Teste zu unempfindlich sind, um sehr geringe Fermentmengen noch zu erfassen. Pepsinähnliche Fermente, die im Plasma ebenfalls vorkommen [2], entziehen sich dem Nachweis ebenfalls. Trotzdem zeigen schon diese orientierenden Versuche eine erstaunliche Vielfalt der Plasmaproteasen. Diese Fermente manifestieren sich im unverdünnten Serum oder Plasma kaum, dies deshalb, weil ein sehr wirksames Inhibitorsystem existiert, welches einerseits vorhandene Aktivitäten überdeckt und andererseits die Aktivierung von inaktiven Profermenten zu verhindern vermag. Es ist im hier diskutierten Zusammenhang von besonderer Bedeutung, daß sich, beginnend schon mit dem Jahre 1908 [5] immer wieder Beobachtungen finden lassen, die darauf hinweisen, daß im Serum Krebskranker diese Hemmstoffe vermehrt vorkommen, daß bei diesen Patienten folglich das allgemeine proteolytische Potential gesenkt ist.

Läßt sich aus dieser Beobachtung ableiten, daß den Plasmaproteasen eine Bedeutung bei der Resistenz gegen das Tumorstadium und insbesondere bei der metastasierenden Verbreitung der Tumorzellen zukommt? Hier soll nur kurz auf einige Beobachtungen hingewiesen werden, die eine solche Möglichkeit als durchaus wahrscheinlich erscheinen lassen.

Daß Krebskranke oft – aber keineswegs immer – eine gehemmte Fibrinolyse aufweisen, ist mehrfach beschrieben worden [3, 4, 6]. Die Arbeiten von *Sumner Wood* [7] wie auch von *Cliffon et al.* [8, 9] zeigen deutlich, daß andererseits der Fibrinolyseaktivierung bei der vaskulären Verbreitung von Tumorzellen eine sehr beträchtliche Bedeutung zukommt. Es sollte dabei nicht außer acht gelassen werden, daß nicht nur das aktive Plasmin, sondern auch dessen Aktivatoren gehemmt sein können. Dem

fibrinolytischen System und damit auch dem Blutgerinnungssystem scheint somit vorwiegend die Bedeutung von indirekt wirkenden Faktoren zuzukommen. Können jedoch Proteasen selbst als «cytotoxische» Faktoren wirken?

Daß diese Möglichkeit zumindest grundsätzlich vorhanden ist, zeigen die Arbeiten von Keller et al. [10] sowie von Uvnäs [11] an Mastzellen, wie auch unsere eigenen Beobachtungen an Blutplättchen [12]. Diese beiden Zellsysteme stellen gewissermaßen Modelle dar, die zugegebenerweise nicht zu allgemeinen Rückschlüssen Anlaß geben sollten. Es ist jedoch auffallend, daß die betreffenden Proteasen, ein chymotrypsin-ähnliches Ferment bei den Mastzellen, Thrombin, Papain und Reptilase bei den Blutplättchen, imstande sind, dieselben Effekte wie das aktivierte Komplementsystem hervorzubringen [11, 13, 14]. Es macht den Anschein, als ob diese Fermente direkt oder indirekt in den Ablauf der Komplementaktivierung einzugreifen vermöchten, was in Anbetracht der wahrscheinlichen Proteasatur zumindest einiger Komponenten des Komplementsystems nicht ganz unerwartet ist. Nur weitere Versuche werden beweisen können, ob sich unter den zahlreichen Plasmaproteasen solche finden, denen ein direkter cytotoxischer Effekt gegenüber Tumorzellen zukommt.

Die ebenso attraktive Möglichkeit einer Cofaktorwirkung der Proteasen ergibt sich aus den Beobachtungen von Ginsburg et al. [15, 16], die im Grunde der Dinge nichts als eine Bestätigung der längst bekannten Tatsache darstellen, daß eine geschädigte im Unterschied zur intakten Zelle rasch der Cytolyse durch externe Proteasen anheimfällt. Der schleppende Verlauf der immunologischen Abwehrreaktion trotz der nachweisbaren Anwesenheit von spezifischen Antikörpern [17] läßt vermuten, daß die Resistenz der immunologisch geschädigten Zelle gegen den endgültigen Zerfall immer noch beträchtlich ist und daß vielleicht gerade Zellaggregate und Zellverbände infolge der Langsamkeit ihrer endgültigen Elimination weiter persistieren und sich schließlich erholen können. Dieser letztgenannte Fall würde tatsächlich den aktiven Plasmaproteasen die Funktion von Cofaktoren immunologischer Reaktionen zuordnen. Es wird zweifellos eine interessante Aufgabe sein, die Richtigkeit der verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten durch experimentelle Arbeiten über den Bestand und die Aktivität der eiweißspaltenden Plasmafermente und ihrer Inhibitoren beim Krebskranken zu überprüfen.

1. Käser-Glanzmann R. und Lüscher E. F.: unveröffentlichte Ergebnisse. – 2. Jørgensen B. M.: Pepsinogen in Blood and Urine. Munksgaard, Copenhagen 1961. – 3. Ungar G. und Darmgaard S.: J. exp. Med. **93**, 89 (1952). – 4. Clifton E. E. und Young L. E.: Cancer **3**, 486 (1950). – 5. Brieger L. und Trebing J.: Berl. klin. Wschr. **45**, 1041, 1349, 2200 (1908). – 6. Shulman N. R.: J. exp. Med. **95**, 593 (1952). – 7. Sumner Wood G., jr.: s. vorstehenden Vortrag. – 8. Clifton E. E. und Agostino D.: Cancer **15**, 276 (1962). – 9. Agostino D., Grossi C. E. und Clifton E. E.: Ann. Surg. **153**, 365 (1961). – 10. Keller R. und Beeger I.: Int. Arch. Allergy **22**, 31 (1963). – 11. Uvnäs B.: Ann. N.Y. Acad. Sci. **103**, Art. 1, 278 (1963). – 12. Lüscher E. F. und Bettex-Gand M.: J. Physiol. (Paris) **53**, 145 (1961). – 13. Bettex-Galland M., Lüscher E. F., Simon G. und Vassalli P.: Nature (im Druck). – 14. Bettex-Galland M. und Lüscher E. F.: unveröffentlichte Beobachtungen. – 15. Ginsburg I.: Brit. J. exp. Path. **40**, 417 (1959). – 16. Ginsburg I. und Ram M.: Nature **185**, 328 (1960). – 17. Finney J. W., Byres E. H. und Wilson R. H.: Cancer Res. **20**, 351 (1960).

M. Jeannet (Berne): Nous avons étudié la fixation de γ_1 -macroglobulines (β_{2M}), représentant probablement des anticorps naturels du type de la properdine, à la surface des globules rouges, in vivo et in vitro.

In vivo, sur 144 tests de Coombs positifs, nous avons trouvé 115 fois que la protéine fixée sur les érythrocytes était du type γ_{1M} (19S) alors que 18 fois seulement il s'agissait d'un auto-anticorps immun de type γ_2 (7S). Dans aucun cas nous n'avons observé la fixation sur les érythrocytes d'un anticorps de type γ_{1A} (β_{2A}). Parmi ces 115 Coombs de type γ_{1M} , une dizaine représentaient la fixation d'agglutinines froides pathologiques sur les érythrocytes, mais dans tous les autres cas il s'agissait probablement de la fixa-

tion d'un anticorps normalement présent dans le sérum sur des cellules endommagées par un facteur toxique circulant.

Effectivement la totalité de ces malades souffraient de maladies inflammatoires graves, d'états septiques, d'intoxications médicamenteuses ou autres ou enfin de cancers avancés.

In vitro il est également possible de provoquer la fixation de γ_{1M} sériques sur les érythrocytes: si l'on endommage la membrane cellulaire par certains enzymes, la thrombine, la papaïne, la trypsine et la neuraminidase, par certaines substances toxiques provenant des produits de dégradation cellulaire, telles que les histones, par des oxydants, comme le periodate, les érythrocytes absorbent une γ_1 -macroglobuline du sérum et le complément, puis sont détruits.

Il semble que la lésion de la membrane produite par ces différentes substances et conditionnant la fixation des γ_{1M} , corresponde à une altération de l'acide sialique érythrocytaire, en grande partie responsable de la charge négative des cellules. Normalement la teneur en acide sialique des globules rouges diminue avec l'âge et c'est peut-être cette altération de leur membrane qui cause leur destruction par fixation d'anticorps naturels. Fait intéressant, on a montré récemment que la charge des leucocytes malins des leucémies et leur teneur en acide sialique est augmentée [Ruhstroth-Bauer G., Klin. Wschr. 39, 764 (1961)]. Peut-être cette anomalie est-elle à mettre en rapport avec le fait que ces cellules malignes échappent au contrôle normal que l'organisme exerce sur la prolifération cellulaire. On pourrait en effet supposer que l'augmentation de leur teneur en acide sialique les protège contre la fixation de γ_1 -macroglobulines et empêche leur destruction subséquente par le complément.

C. Mor et M. Sforza (Milan): Recherches sur la métastatisation par voie hématogène

Une des caractéristiques spécifiques des tumeurs malignes est leur possibilité de former des métastases. Au point de vue du pronostic la métastase est un des plus importants facteurs envisagés sous l'aspect clinique, avec tous les problèmes prophylactiques et thérapeutiques qui en dérivent.

Le nombre des recherches concernant la genèse de la propagation des métastases est très grand. Leur but est d'éclaircir les causes et les mécanismes qui règlent la diffusion métastatique. La diminution de la cohésion des cellules néoplasiques entre elles est la théorie la plus connue et la plus généralement admise. On admet aussi la théorie mécanique de Walther, selon laquelle la distribution des amas de cellules néoplasiques suit les lois anatomophysiologiques de la circulation hémolympatique.

Plusieurs auteurs ont critiqué cette dernière théorie en la jugeant insuffisante.

Nous avons fait des recherches expérimentales sur le rat en employant le carcinosarcome de Walker sous forme solide et sous forme ascitique et nous avons observé ce qui suit.

Si l'on injecte des cellules tumorales dans les veines et dans les artères, la distribution métastatique ne suit qu'en partie une loi mécanique.

En effet le poumon est, sans doute, l'organe le plus atteint; l'injection dans une veine de la circulation générale y produit des métastases dans 94% des cas contre 6% dans d'autres organes.

Les cellules néoplasiques franchissent en grand nombre le premier filtre capillaire quel que soit l'organe.

Quelques organes, et surtout le foie, présentent une résistance sélective au développement métastatique, cela même si l'on peut y déceler histologiquement des cellules néoplasiques et si la greffe d'un fragment de foie dans un animal de la même espèce donne naissance à une tumeur.

Ayant fait des recherches sur les causes possibles d'une sélectivité de développement des métastases au niveau de chaque organe, et admettant la certitude que les cellules néoplasiques en suivant les courants hémolympatiques peuvent arriver à tous les organes, nous avons considéré les différents facteurs qui participent à ce phénomène.

Le rapport volume des amas, section du vaisseau et vitesse du flux hématique est sans doute important. En effet, nous avons produit un obstacle à la circulation veineuse du foie et du rein et nous y avons observé des localisations métastatiques des cellules injectées par voie intraveineuse. Il faut tenir compte du fait qu'on obtient ces résultats soit en injectant du carcinome de Walker solide (petits fragments de tissu), soit du Walker ascite (cellules suspendues dans un liquide), ce qui est sûrement plus près de ce qui s'observe en clinique, dans la plupart des cas.

Un deuxième facteur pourrait être le facteur des propriétés intrinsèques antiblastiques de chaque organe. Nos recherches expérimentales n'ont d'ailleurs apporté dans ce cas aucun résultat définitif.

La diminution de la résistance d'un organe à la suite de variations de nature différente (physique, chimique, inflammatoire) pourrait constituer un troisième facteur. Nous avons expérimenté sur le rat en traumatisant ses viscères, en provoquant des fractures de membres, des combustions de la peau, des lésions d'un degré élevé du rein et du foie à la suite d'un traitement avec du thiomérid et du CCl_4 ; mais nous n'avons obtenu aucun résultat prouvant ce troisième facteur, et cela en contradiction avec ce que d'autres auteurs avaient observé.

Un quatrième facteur peut être lié à des conditions d'innervation, dont nous n'avons aucune connaissance.

Le facteur hormonal peut en être le cinquième.

Nous avons fait des recherches dans ce sens, en injectant le carcinosarcome de Walker ascite, par voie veineuse et nous avons obtenu une petite augmentation du nombre des métastases, comparé à celui des animaux traités avec de la parathormone, de la cortisone, de la testostérone. Nous n'avons pas observé de variations avec de l'extrait épiphysaire, STH, ACTH, DOCA, de la thyroxine, des œstrogènes.

Le nombre des métastases avait diminué avec la progestérone. Aucune des hormones employées n'a modifié le foyer des localisations métastatiques.

Un autre facteur encore est donné par l'activité du SRI qui, selon tous les auteurs, est capable d'une réelle action antiblastique. Toujours chez le rat, la stimulation du SRI (œstrogènes, lysozyme) démontre la possibilité de diminuer soit l'augmentation des tumeurs en valeur absolue, soit la diffusion des métastases.

Le contraire se manifeste par suite d'un blocage, même que partiel, du SRI avec de la cortisone, de la polyvinylpyrrolidone, etc.

Le dernier facteur est celui qui concerne le rapport d'immunité entre la tumeur et son hôte; on fait beaucoup de recherches, dans le monde entier, concernant ce dernier facteur, et nous aussi, sommes en train d'en faire.

Nous avons même effectué quelques recherches dans le domaine clinique; nous avons examiné les rapports d'autopsies de 1119 patients morts de tumeurs malignes, de 1939 à 1959 dans des hôpitaux (sur un total de 9000 autopsies). Ces rapports nous ont confirmé quelques données expérimentales.

Nous avons divisé les cas selon les schémas de métastatisation de Walther, nous avons pu remarquer ce qui suit: dans les tumeurs qui donnent des métastases de la deuxième espèce (espèce «foie»), c'est-à-dire dans le poumon, sur 134 tumeurs, 17 avaient donné des métastases pulmonaires et 7 les avaient provoquées dans les organes du grand courant sans localisations pulmonaires. Sur 315 tumeurs du troisième type («cave»), 63 avaient donné des métastases hématogènes du poumon et 71 des métastases hématogènes dans d'autres organes sans métastases pulmonaires. Sur 431 tumeurs du quatrième type («porte») 189 avaient engendré des métastases dans le foie et 39 dans d'autres organes sans métastases hépatiques. Enfin dans ce même groupe, 45 des cas de métastases hépatiques avaient donné des métastases hématogènes au deuxième filtre, c'est-à-dire au poumon, alors que 8 cas avaient provoqué des métastases dans d'autres organes en franchissant le poumon.

Il est évident que ceci ne signifie pas que dans les organes traversés les cellules néo-

plasiques étaient absentes, mais seulement que le développement d'une tumeur ne s'était pas produit.

Ainsi à la suite de nos recherches expérimentales et cliniques, nous sommes arrivés à la conclusion suivante :

La théorie de Walther indique seulement où les cellules, qui se sont séparées d'une tumeur, sont canalisées selon les données déjà connues de l'anatomie du système vasculaire et lymphatique. Une « véritable » théorie de la métastatisation doit expliquer, selon notre avis, pourquoi les cellules s'implantent au niveau d'autres organes, et pourquoi le développement montre si souvent une prédilection pour certains organes.

Cela exige une connaissance plus profonde de la biologie des cellules néoplasiques au niveau des différents organes, et l'avenir seul pourra nous donner une réponse définitive.

Lit.: *Carlo Mor, Mario Sforza: Le Metastasi (Ia parte), Archivio Italiano di Patologia e Clinica dei Tumori, vol. V, 1-2, 249-340 (1962).*