

کمپلکس پذیرنده انسولین - لیپوزوم

دکتر: مهدی نصرت‌آبادی - دکتر ناصر ملک‌نیا - دکتر سیوش گرایش‌نژاد - دکتر حسن محمدیها

مقدمه:

تشخیص هورمون مهم می‌باشد (۲۰-۲۱ و ۲۲)، فسفولیپیدی (۲۳ و ۲۴) و کربوهیدرات می‌باشند (۱۶). وزن ملکولی این ترکیبات بین ۲۰۰ تا ۵۵۰ هزار متغیر است. پذیرنده انسولین که به صورت تقریباً "خالص تهیه شده دارای وزن ملکولی تقریبی ۲۰۰ هزار می‌باشد (۱۶). این ترکیب گلیکوپروتئینی دارای ساختمان اولیگومریک بوده و احتمالاً " دارای چهار یا بیشتر جایگاه برای پیوند هورمون است (۱۳ و ۱۸ و ۱۹).

هرگونه تغییری در پذیرنده انسولین اعم از تعداد پذیرنده‌ها، میل ترکیبی و شکل فضائی موجب اختلال در پیوند هورمون پذیرنده خواهد شد که نتیجه آن بی‌اثر شدن هورمون می‌باشد.

با اطلاع از اینکه در سالهای اخیر آنزیم‌های گوناگون را که فقدان آنها در انسان مشاهده می‌شود، بوسیله لیپوزومها (وزیکولهای با دولایه فسفولیپیدی) وارد سلول ساخته اند (۲۵-۲۶-۲۷) هدف از این تحقیق خالص‌سازی پذیرنده‌های انسولین و وارد ساختن آنها بدرون لیپوزومها است و درآینده شاید این عمل راه گشائی برای وارد ساختن پذیرنده‌های انسولین در سطح سلولهای مورد نظر باشد. بدین جهت در این بررسی با روشهای مختلف پذیرنده انسولین در حد مناسبی خالص گردید و در لیپوزومی که ساخته شده بود وارد گردید.

هورمونهای پلی‌پپتیدی و کاته‌کولامینها - پذیرنده‌ای (Receptor) در سطح سلولی متصل شده و کمپلکس هورمون - پذیرنده را می‌سازند، که در نتیجه عامل موثر (Effector) در سطح داخلی سلول موجب سنتز پیامبر دوم و یا سوم [آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP)] می‌گردد. در نتیجه این عمل آنزیم پروتئین کیناز فعال شده موجب فسفریله کردن بعضی آنزیمها می‌شود که منجر به فعال یا بی‌اثر شدن آنزیم خواهد شد، و از طرفی سبب سهولت در امر ترابری مواد از غشاء سلولی می‌گردد (۱-۲-۳-۴-۵-۶ و ۷-۸). عمل بیشتر هورمونهای پروتئینی در غیاب کلسیم مهار می‌شود، ولوآنکه قدرت افزایش و کاهش CAMP مختل نشده باشد (۹). بنابراین کلسیم از طریق متصل شدن به کالמודولین Calmodulin ممکن است یک دستور دهنده نهائی در ترشح و عمل هورمون باشد (۱۰ و ۱۱).

با توجه به شرح فوق مشاهده می‌شود، پذیرنده یکی از ارکان اصلی در نحوه اثر هورمون است. در عدم ترشح هورمون میتوان به وسیله‌ای هورمون را وارد بدن ساخت ولی در اثر مختل شدن عمل یا فقدان پذیرنده، وجود هورمون بی‌اثر خواهد بود (۱۲-۱۳-۱۴-۱۵-۱۶-۱۷-۱۸-۱۹ و ۲۰).

پذیرنده‌ها بطور کلی شامل ترکیب پروتئینی که برای

روش کار

۱- خالص سازی پذیرنده ها:

برای خالص سازی پذیرنده ها تا بحال روشهای مختلفی بکار میرفت که عبارت بودند از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (سفادکس G50) (۲۸)، تعویض یون دی اتیل آمینو اتیل سلولز (DEAE - سلولز) و غیره که در این بررسی روشها مورد تأیید قرار نگرفت.

خالص سازی کامل پذیرنده های انسولین بوسیله کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی طبق روش اولفسکی انجام شد (۳) در این روش غشاءهای کبدی محلول شده در محلول ۲٪ تریتون X100 (۵۲) بمدت ۴۰ دقیقه در ۲۴ درجه سانتی گراد تکانداده شده و سپس در ۱۰۰۰۰۰g بمدت ۷۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع روئی در تامپون تریس ۵M/۰/۰، (PH ۷/۴) که حاوی ۰/۲٪ تریتون میباشد دیالیز گشت. رسوب زیاد حاصله با سانتریفوژ خارج شد. در تهیه ستون از یک گرم سفاروز فعال شده CNBr با 1 mM HCl اسه بارشسته شد (زل اسید ۲۰۰ ml/g). برای پیوند انسولین به سفاروز فعال شده، ۱۰ میلی گرم انسولین گاوی در حضور تامپون ۰/۲ M سیترات سدیم، ۰/۷ M کلرور سدیم، ۰/۶ M اوره (PH ۶/۴) قرار گرفت (۳۱).

۱۰ میلی لیتر از مایع روی سانتریفوژ شده با هستگی در ۴۰ درجه سانتی گراد بر روی یک ستون (پی پت پاسنور با حجم کل ۱/۳ میلی لیتر) کروماتوگرافی شد، ستون قبلاً با تامپون ۰/۱ M بیکربنات سدیم (PH ۸/۴) شسته و بمدت ۲ ساعت با تامپون تریس ۵M/۰/۰، حاوی ۱٪ تریتون ۱۰۰-X به حالت تعادل در آورده شده بود. قبل از شروع کار ستون با تامپون فوق یکبار شسته شد و حدود ۵۰ لوله که هر کدام حاوی ۱ میلی لیتر بودند، جمع آوری گردید. عمل استخراج از لوله ۳۷ به بعد با تامپون ۵M/۰/۰ استات سدیم (PH ۶) محتوی ۴/۵ M اوره و ۰/۱ درصد تریتون انجام شد. پس از افزودن تامپون بر روی ستون عمل استخراج بمدت ۱۵ دقیقه قطع شد. میزان پروتئین با روش لوری Lowry (۲۹) و پیوند اختصاصی انسولین I125 با روش پلی اتیلن گلیکوکول (۳۲) تعیین و منحنی تغییرات رسم شد.

۲- ساختن لیپوزوم:

برای ساختن لیپوزومها از روش Ryman و همکاران

(۲۵) استفاده شد. لسیتین - کلسترول - دی ستیل فسفات به نسبت ۱:۲:۱۰ مولار در یک میلی لیتر کلروفرم تحت گاز ازت و دستگاه خلا (مدل THEL CO 29) خشک گردید. لیپید خشک شده در تامپون ۵M (PH ۷/۴) و یا در تامپونی که در RIA انسولین بکار میرود به حالت تعلیق درآمد.

۳- داخل سازی پذیرنده های انسولین بدرون

لیپوزومها:

در داخل سازی از روش بانگام و همکاران (۳۲) استفاده شد که در این روش ماده را (مثل انسولین، آنزیم پذیرنده های انسولین و غیره) به لیپوزومها اضافه کرده و بمدت ۳۰ دقیقه در دستگاه تکاندنده قرار میدهند. برای یکنواخت و دو لایه شدن، لیپوزومها به مدت یک دقیقه تحت تاثیر اولتراسون با راندمان ۵۰ قرار گرفتند (۳۲). برای آگاهی از راه یافتن ماده بدرون لیپوزوم از انسولین دارای ید رادیواکتیو استفاده گردید. لیپوزوم ۳ ساعت در ماکریم ۱۰۰/۰۰۰z با استفاده از روتور T-50 سانتریفوژ گردید (اولتراسانتریفوژ یکمن مدل L5-50) و سپس داخل سازی در ته نشست لیپوزومها به صورت رادیواکتیو مورد بررسی قرار گرفت. چون قسمت بیشتری از ترکیب، داخل لیپوزومها نمیگردد با استفاده از روشهای زل فیلتراسیون - سانتریفوگاسیون و دیالیز قسمتهای اضافی برداشته شد.

نتایج و بحث:

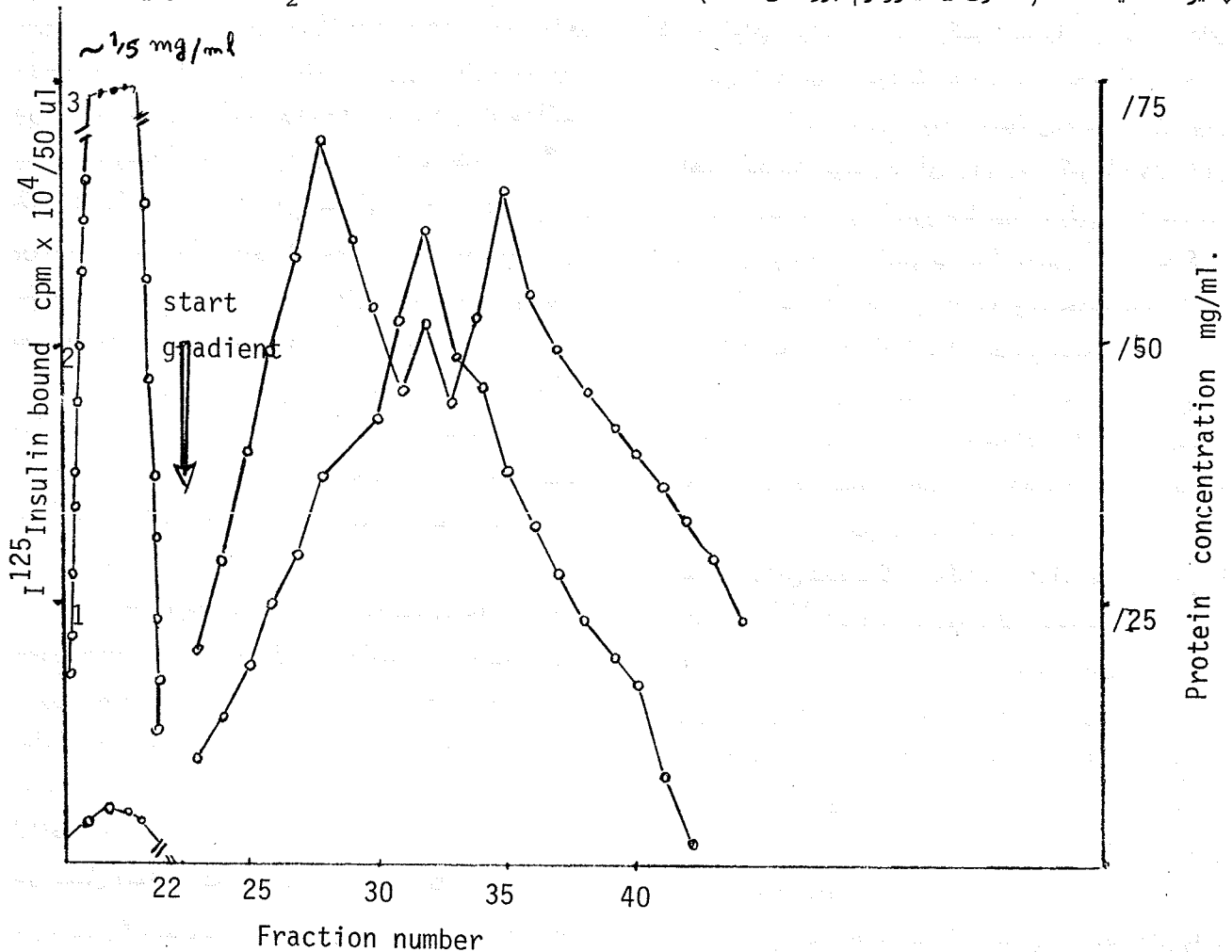
در خالص سازی پذیرنده های انسولین بوسیله کروماتوگرافی روی - سلولز طبق نتایج حاصل قبل از عبور دادن غشاء محلول شده از ستون به ازاء هر میلی گرم پروتئین $7/3 \times 10^3$ cpm انسولین رادیواکتیو به آن پیوند میشود، در حالیکه بعد از آنکه غشاء محلول شده از ستون عبور داده شد در لوله ۳۲ که حداکثر پیوند انسولین دارای ید ۱۲۵ به پذیرنده اش مشاهده میشود، به ازاء هر میلی گرم پروتئین $9/4 \times 10^4$ cpm انسولین رادیواکتیو پیوند شده بود که در این حالت خالص سازی به میزان دوازده مرتبه افزایش نشان می دهد

* Virconic cell disrupter model 16-850

$4/1 \times 10^4$ انسولین رادیواکتیو پیوند میشود، که این میزان پیوند به ازاء هر میلی گرم آن $4/1 \times 10^4 \times 10^3$ cpm میباشد. چنانچه نسبت $\frac{4/1 \times 10^4 \times 2}{3}$ نشان میدهد در این حالت عمل خالص سازی تا حدود 1100% مرتبه صورت گرفته است که در مقایسه با خالص سازی بر روی DEAE- سلولز رقم بسیار بزرگی است.

در این روش برای اعتماد از پیوند شدن انسولین به سفاروز فعال شده آنرا چندین بار با تامپون مربوطه شسته و حاصل شستشو از نظر پروتئینی مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین برای آنکه بقیه گروه های فعال باقیمانده احتمالی در سفاروز پوشیده شوند از یک محلول یک مول اتانول و یا گلیسین استفاده شد و چندین بار (حداقل سه بار) سفاروز- انسولین شسته شده، بدین ترتیب NH_2 موجود در گلیسین بقیه عوامل

در خالص سازی پذیرنده های انسولین — روش کروماتوگرافی همانطوریکه در منحنی زیر مشاهده میشود در چهار لوله $41, 40, 39, 38$ پذیرنده های انسولین خارج شده اند. میزان پیوند انسولین رادیواکتیو در هر لوله با روش پلی اتیلن گلیکوکول اندازه گیری شد و نشان داد که قبل از بکار بردن نمونه بر روی ستون به ازاء هر میلی گرم پروتئین 7×10^3 cpm انسولین رادیواکتیو پیوند میشود. بعد از دیالیز و تغلیظ چهار لوله بوسیله کیسه های سلوفان و تامپون فسفات $0.1 M$ (PH 7.4) میزان پروتئین تعیین میشود و نشان میدهد که در هر میلی لیتر آن ۵۰ میکروگرم پروتئین پذیرنده وجود دارد. میزان پیوند انسولین I^{125} با پذیرنده تعیین شده نشان میدهد که به ازاء هر 100 میکرولیتر پذیرنده تغلیظ شده (محتوی ۵ میکروگرم پروتئین است)



partial purification of insulin receptor of liver-cell membranes on DEAE-cellulose.

فعال باقیمانده سفاروز - انسولین را می پوشاند. برای اعتماد بیشتر که گروه فعال دیگری در انسولین - سفاروز باقی نمانده است، از ستون هموگلبین رقیق شده عبور داده شد (۸۰ میکروگرم هموگلبین در هر ۱۰۰ میکرولیتر) و در صورت پیوند شدن هموگلبین به انسولین - سفاروز، احتمال وجود گروه فعال باقیمانده میرفت.

در داخل سازی پذیرنده های انسولین به لیپوزومها نتایج نشان داد که میتوان میزان ۱۲ تا ۱۴٪ درون لیپوزوم داخل کرد (لیپوزومهایی که با استفاده از لسیتین - کلسترول دی ستیل فسفات تهیه شده اند). سونیکاسیون لیپوزومها در حضور انسولین رادیواکتیو هیچگونه اثری بر روی دخول آن ندارد و فقط موجب کوچک شدن لیپوزومها و دولایه شدن لیپوزومهای چند غشائی میشود (۳۰)، بطوریکه در حد متوسط 10^5 cpm انسولین رادیواکتیو در حضور و عدم حضور سونیکاسیون بیش از ۱۴٪ آن بدون لیپوزومها وارد نمیشود. در این بررسی چهار لوله ۴۱، ۴۰، ۳۹، ۳۸ را که حداکثر میزان پذیرنده انسولین در آنها میباشد توسط دستگاه* در خلأ تغلیظ شد. در هر میلی لیتر این محلول ۴ میلی گرم پروتئین (پذیرنده انسولین) وجود داشت. طبق منحنی زیر غلظتهای مختلف پذیرنده در مجاورت لیپوزومها و میزان معین انسولین رادیواکتیو (10^5 cpm) قرار گرفت.

همانطوریکه در منحنی سینتیک پذیرنده های انسولین مشاهده میشود در غلظت ۶۰۰ میکروگرم که معادل ۳۸۰۰۰ CPM پیوند انسولین رادیواکتیو به پذیرنده میباشد حداکثر (۳۸٪) داخل سازی کمپلکس پذیرنده انسولین رادیواکتیو مشاهده میشود.

همانطوریکه قبلاً شرح داده شد در حالت عادی بدون حضور پذیرنده حداکثر ۱۴٪ انسولین رادیواکتیو بدون لیپوزوم راه مییابد، لذا تفاوت ۳۸٪ از ۱۴٪ که معادل ۲۴٪ است نشان دهنده دخول پذیرنده های انسولین به درون لیپوزومها است. بدین ترتیب که بطور متوسط به ازاء هر ۱۸۰ میلی گرم مخلوط لیپید (لستین - کلسترول - دی ستیل فسفات) که برای تهیه لیپوزوم بکار میرود میتوان ۰/۶ میلی گرم پذیرنده انسولین را بدون آنها وارد ساخت. در تجربه دیگری غلظتهای مختلف از پذیرنده های انسولین در مجاورت لیپوزومها همراه با میزان معین انسولین

رادیواکتیو قرار گرفت (پذیرنده هایی که با روش کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی جدا شده بودند). منحنی تغییرات سنتیک پذیرنده های انسولین (شکل زیر) در این حالت نشان میدهد در غلظت ۷ میکروگرم پذیرنده که حداکثر میزان پیوند انسولین است حداکثر میزان داخل سازی پذیرنده های انسولین به درون لیپوزوم نیز مشاهده گردید. در این حالت پذیرنده های انسولین که توسط کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی خالص شده بودند تا میزان ۳۴ درصد قابل دخول بدون لیپوزومها بودند.

چنانچه نتایج حاصله نشان داد خالص سازی پذیرنده های انسولین با DEAE - سلولز در حد کم است (۱۲ بار) و هنوز مواد دیگری همراه پذیرنده میباشد که در هنگام مطالعه سینتیک پذیرنده ها ایجاد واکنش متقابل میکنند.

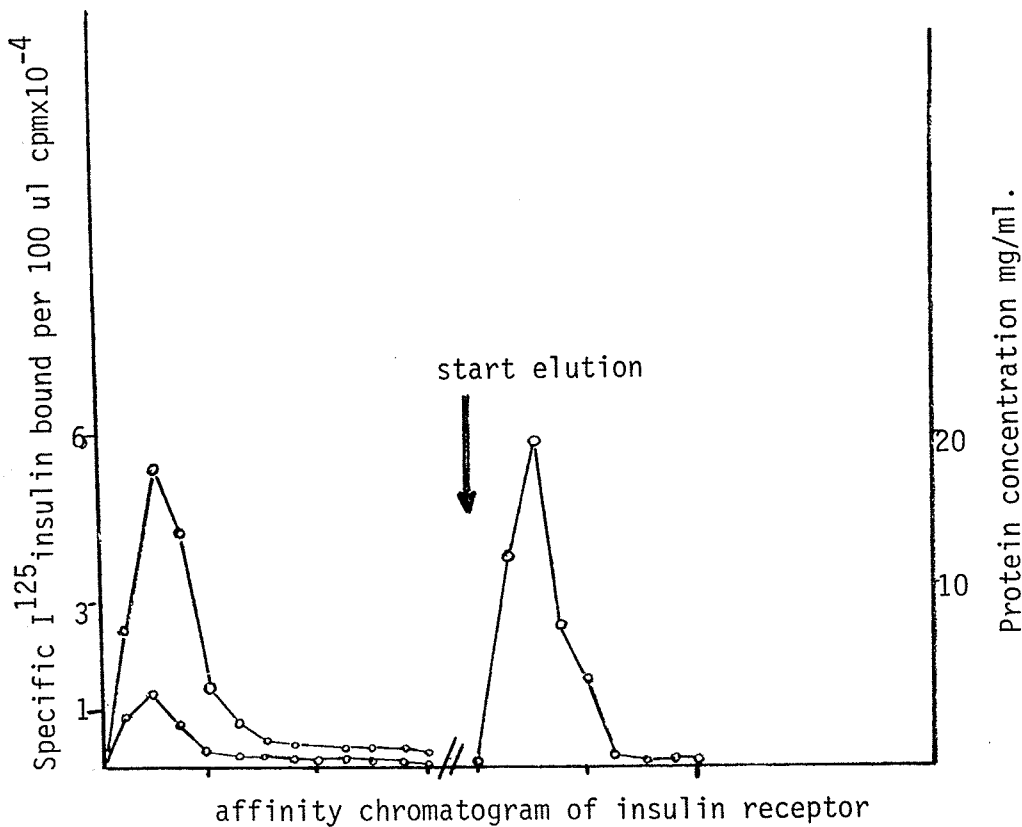
کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی تقریباً "پذیرنده های انسولین را تا میزان نزدیک به ۱۱۰۰ مرتبه خالص ساخت. در داخل سازی پذیرنده انسولین به درون لیپوزومها مشاهده شد که انسولین دارای I_{125} حداکثر تا میزان ۱۴٪ قادر به ورود به درون لیپوزومها میباشد ولی در غلظتهای مختلف پذیرنده های انسولین با I_{125} حداکثر داخل سازی تا ۳۸٪ افزایش یافت، و نتیجه نشان داد که به میزان ۲۴٪ پذیرنده های انسولین خالص شده با DEAE - سلولز را میتوان درون لیپوزومها جای داد. بدین معنی که در غلظت ۶۰۰ میکروگرم پذیرنده حداکثر داخل سازی صورت میپذیرد و در صورتیکه غلظت پذیرنده از این میزان هم بالاتر رود اثر بر داخل سازی ندارد. چنانچه پذیرنده های انسولین خالص شده با کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی را با انسولین I_{125} مجاور لیپوزومها قرار دهند حداکثر میزان داخل سازی ۴۸٪ است که در این حالت داخل سازی تا میزان ۳۴ درصد صورت میگیرد. غلظت پذیرنده در این شرایط ۷ میکروگرم است. طبق نتایج قبلی افزایش غلظت بر میزان داخل سازی نمی افزاید. چنین نتیجه میشود که پذیرنده های انسولین را همانند انسولین میتوان در درون لیپوزومها جای داد.

سئوالاتی مطرح است که میتوان پذیرنده های وارد شده را با لیپوزومها از طریق ورید تجویز کرد و آنها را بیدن انتقال داد، واکنش کمپلکس پذیرنده - لیپوزوم در سطح

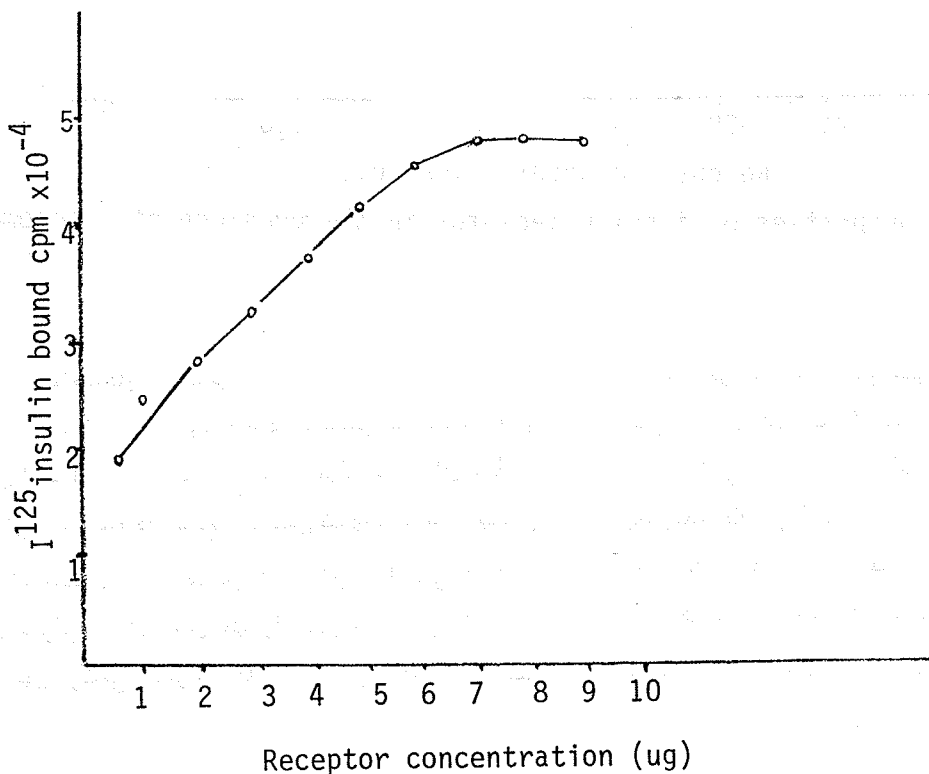
* Thel. Co model 29 GCA precision Scientific

انتقال داد .
 پاسخ به سئوالات مطرح شده در شرایط فعلی بسیار
 مشکل است و این آینده است که پاسخ های قانع کننده ای
 فراهم خواهد ساخت .

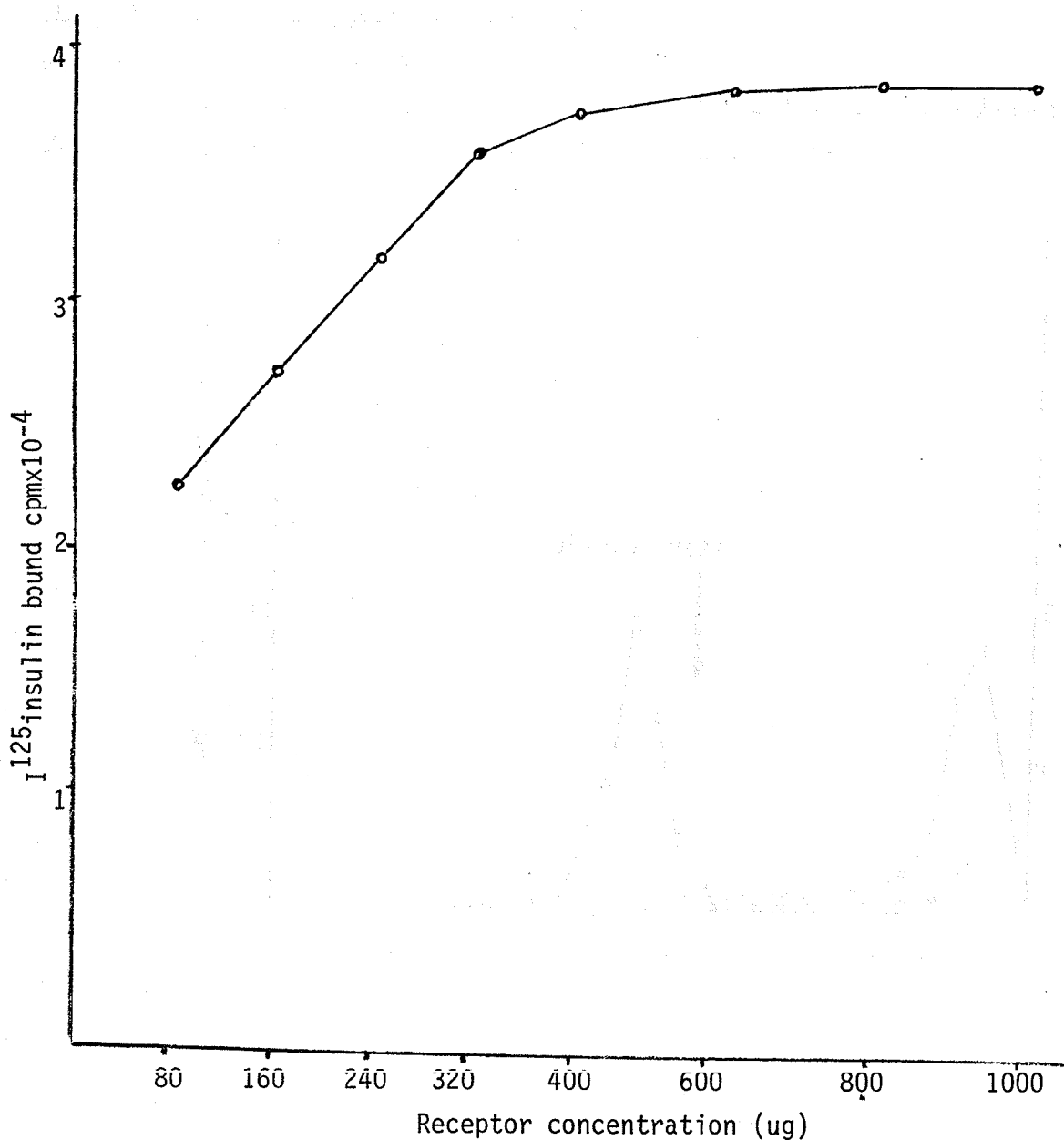
سلولی چگونه است و آیا میتوان پذیرنده های انسولین را
 بتوسط لیپوزومها در غشاء سلول جای داد .
 آیا شایسته تر نیست که لیپوزومها را از لیپید
 بافت مورد مطالعه تهیه کرد و به توسط آنها پذیرنده را



affinity chromatogram of insulin receptor



Kinetic properties of insulin receptor in the presence of liposomes



Kinetic properties of insulin receptor in the presence of liposomes.

مشاهده گردید که ۱۲ بار خلوص در روش کروماتوگرافی با سلولز - DEAE، با بکار بردن روش کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی به ۱۱۰۰ بار افزایش یافت - میزان دخول این پذیرنده ها در لیپوزوم با تهیه لیپوزوم از لسیتین - کلسترول و دی ستیل فسفات (۱۰:۱:۰.۲) مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده گردید تا میزان ۱۴% انسولین دارای ید رادیواکتیو میتواند وارد در لیپوزوم گردد. در تجربه

خلاصه فارسی

اختلال در پذیرنده های انسولین موجب پیدایش بسیاری از بیماریهای انسان و حیوان میگردد. برای شناخت بهتر این پذیرنده که نتایج آن پیش گیری و درمان این اختلالات است در این تحقیق باروشهای مختلف کروماتوگرافی بر روی سلولز - DEAE، ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی پذیرنده های انسولین خالص گردیدند.

دیگری که پذیرنده های انسولین بروش کروماتوگرافی سلولز DEAE - تا حدی خالص شده بودند حداکثر دخول انسولین I^{125} به لیپوزوم به ۲۸٪ رسید. (غلظت پروتئین پذیرنده در این تحقیق ۶۰۰ میکروگرم بود) بنابراین میزان دخول این پذیرنده ها ۲۴٪ نشان داده شد.

پذیرنده های انسولین خالص شده با روش کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی، میزان دخول در لیپوزوم را تا ۴۸٪ افزایش داد.

SUMMARY

Errors in insulin receptors in various pathological conditions needs study of insulin reseptors. Purification and sequence molecular are first considered. For this purpose insulin receptors were purfied by various methods. Liver membrane is solubilized by triton X-100, Chromatography on DEAE-cellulose has demonstrated that insulin receptors can be purified up to about 12 fold. With the use of affinity chromatography it can be purified up to 1100 fold.

To study Whether insulin receptors, like many other compounds can incorporate into liposomes (vesicles with two phospholipid layer), liposomes were prepared by lecithine, cholestrol, dicetye phosphate in the molar ratio of 1:2:10.

Experiments have shewn that up to 14% of I^{125} -insulin can incorporate into liposomes. In another experiment various concentrations of insulin receptors, partially purified by DEAE-cellulose chromatography were put in contact with liposomes, showed that the maximum incorporation of I^{125} -insulin receptor complex was about 33%, and this is achieved with a cocentration of 600 ug of receptor protein. Thus up to 24% of insulin receptors can incorporate into liposomes.

Insulin receptors, purified by affinity chromatography also were put in contact with liposomes and showed an incorporation ability of I^{125} -insulin receptor complex in liposomes up to 48%. At this achievement the cocentration of receptor was 7ug (i.e. 34% incorporation).

References:

- 1- Hecther, O. and Calek, A. Jr., Acta Endocrinol. Suppl., 191, 77: 39-49, 1974.
- 2- Sutherland, E.W. and Rall T.W., Pharmacol. Rev. 12: 265-299, 1960.
- 3- Stadie, W.C., Haugaard, N., Marsh, J.B., et al. Am. J. Med. Sci, 218: 265-274, 1949.
- 4- Bradshaw, R.A. and Frazier, W.A., Curr. Top. Cell Regul., 12: 1-37, 1977.
- 5- Catt, K.J. and Dufau, M.L., Annu. Rev. Physiol., 39: 529-557, 1977.
- 6- Cuatrecasas, P., Annu. Rev. Biochem., 43: 509-538, 1974.
- 7- Catt, K.J., et al., Biol. Reprod., 14: 1, 1976.

- 8- Cuatrecasas, P. and Hollenberg, M.D., *Adv. Protein Chem.*, 30:251, 1976.
- 9- Grodsky, G.M., in "Harper's Review of Biochemistry", Rodwell, W.W.: Martin, D.W., and Mayes, P.A. (eds), 18th. ed., Lange (publ.) pp. 463-467, 1981.
- 10-Means, A.R., and Dedman, J.R., *Nature*, 285:73, 1980.
- 11-Rasmussen, H., *Cell Tissue Interactions*, 32: 243, 1978.
- 12-Ferychet, P., and Forgeuc, E., *Diabetes, Suppl.* 23: 35-43, 1974.
- 13-Rabinowitz, D., *Ann. Rev. Med.* 21: 241-258, 1970.
- 14-Kahn, C.R., *Methods in membrane Biology*, 3: 81-146, 1975.
- 15-Flier, J.S., Kahn, J. Roth. and Bar, R.S., *Science*, 190:63-65 1975.
- 16-Soll, A.H., Kahn, C.R., Neville, D.M. Jr. and Roth, J.J., *Clin. Invest.*, 56: 769-780, 1975.
- 17-Olefsky, J. and Virginia, C. and Bacon, Soniarbaur., *Metabolism*, 25/2:179-191. 1976.
- 18-Ginsberg, C. Barryh., Kahn, R. Roth, Jesse. and Pierre de Meyts., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73/4: 1068-1074, 1976.
- 19- Ginsberg, B.R., Cohn, M. and Kahn, C.R., *Diabetes, Suppl.* (1), 25:322, 1976.
- 20-Tate, R.L., Holmes, J.M., Kohn, L.O. and Winond, R., *J. Biol. Chem.*, 250:6527-6535, 1975.
- 21-Brien, O.R.D., Eldeferawi, M.E. and Eldefrawi, A.T., *Annu. Rew. Pharm.* 12:19-34, 1972.
- 22-Lefkowitz, R.J., Roth, J. and Pastan, I., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 185:195-209, 1971.
- 23-Pohl, S.L., Krans, H.J., Kozyreff, L., Jirnbaumer, L. and Rodbell, M.J. *Biol. Chem.*, 246: 4447-4454, 1971.
- 24-Cuatrecasa, P., *Annu. Rev. Biochem.*, 43:169-214, 1974.
- 25-Patel, H.M. and Ryman, B.E., *FEBS. Lett.* 62; 60-63, 1976.
- 26-Colley, C.M. and Ryman, B.E., *Biochem. Soc. Trans.* 2: 871-872, 1974.
- 27-Patel, H.M. and Ryman, B., E., *Biochem. Soc. Trans.* 2: 1014-1017, 1974.
- 28-Cautrecasas, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63:450-457, 1969.
- 29-Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R., *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.
- 30- Olefsky, J.M., Crapo, P.A., Ginsberg, H. and Reaven, G.M., *Metabolism* 24:495-503, 1975.
- 31- Cuatrecasa, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1277-1281, 1972.
- 32- Bangham, A.D., Hill, M.W. and Miller, N.G.A., in: *Methods in membrane Biology*, Korn E.D. ed. Vol. 1, pp. 1-68, Plenum Press. 1974.