

## KORTIKOID-RECEPTOROK A KÖZPONTI IDEGRENSZERBEN

STARK ERVIN, az MTA levelező tagja, ÁCS ZSUZSANNA, PALKOVITS MIKLÓS,  
az orvostudományok doktora és FOLLY GÁBOR

Közlésre érkezett: 1974. IV. 2.

A kortikoidok visszajelentő hatása fontos szerepet tölt be az ACTH-elválasztás szabályozásában (ld. Ganong, 1963; Fortier, 1966; Yates és mtsai, 1971).

A hypothalamus bizonyítottan a visszajelentés helyének tekinthető (ld. Mangili és mtsai, 1966; Yates és mtsai, 1971).

Több mint huszonöt évvel ezelőtt Sayers úgy vélte, hogy a kortikoidok visszajelentésének helye a hypophysis (Sayers és Sayers, 1948). Újabb vizsgálatok eredményei is amellett szólnak, hogy az ACTH-elválasztást a kortikoszteroidok közvetlenül a hypophysisre hatva is gátolni képesek (Fleisher és Vale, 1968; Dunn és Chritchlow, 1969; Gonzales-Luque és mtsai, 1970; Kracier és mtsai, 1972). Saját korábbi vizsgálataink ellentmondanak ennek a nézetnek (Stark és mtsai, 1968).

Más vizsgálatok azt mutatták, hogy az ACTH-elválasztást a kortikoszteroidok extrahypothalamikus központi idegrendszeri struktúrák közvetítésével is befolyásolják (Corbin és mtsai, 1965; Davidson és Feldman, 1967; Bohus és mtsai, 1968; Slusher és Hyde, 1969). Intézetünkben végzett újabb kísérletek szerint a hypothalamus eltávolítása után is kimutatható az exogén kortikoszteroidoknak mind a nyugalmi, mind a sztrezz okozta ACTH-elválasztást gátló hatása (Stark és mtsai 1973/74). Ez a megfigyelés arra utal, hogy számolni kell a kortikoszteroidok visszajelentő hatásával extrahypothalamikus területeken és talán a hypophysisben is.

Jelenleg a receptorok jelenlétét a specifikus kortikoszteroid-hatás egyik előfeltételének tekintik. Ennek alapján azt a kérdést, hogy a kortikoszteroidok visszajelentő hatása a központi idegrendszer mely területén érvényesülhet úgy vizsgáltuk, hogy meghatároztuk: hol vannak specifikus kortikoszteroid-receptorok. Kortikoszteroid-receptornak azokat a makromolekulákat nevezik, amelyek a kortikoszteroidokat azok biológiai hatékonyságával arányos specificitással, nagy affinitással kötik, és amelyek telítődnek a sejtben élettani körülmények között előforduló hormonkoncentráción. A hormon-receptor kötés jellemzője, hogy időben megelőzi a kortikoszteroid mérhető hatásának kifejlődését, és a receptor a hormon lebontási termékét nem köti (Litwack és mtsai, 1972).

### Módszerek

CFE törzsből származó hím patkányokat szabályozott hőmérsékletű ( $24 \pm 1$  °C) és relatív páratartalmú (50–60%) helyiségben tartottunk.

#### *Kortikoszteron felhalmozás mérése in vivo*

Kontroll és 7 nappal korábban mellékveseirtott állatoknak  $50 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -kortikoszteront (1,2- $^3\text{H}$ -corticosterone, 36 Ci/mM, Amersham, Anglia) adtunk intraperitoneálisan (i. p.). Egy mellékveseirtott állatsoport a  $^3\text{H}$ -kortikoszteron injekció előtt 30 perccel 3 mg kortikoszteront (Fluka) kapott i. p. (McEwen és mtsai, 1969). Két órával később az állatokat leöltük, az agyat az a. carotison keresztül 20 ml hideg fiziológiás konyhasó oldattal gyorsan átmostuk, majd belőle felületes fagyasztás után kriosztátban, frontális síkban történő metszésekkel  $300 \mu\text{m}$  vastag szeleteket készítettünk. A szeletekből hideg tárgylemezen kivágtuk a vizsgálandó agyterületeket (1. ábra). A szövet súlyát mértük, majd 1 ml/100 mg Soluene<sup>TM</sup>-t (Packard Sample Solubizer) adtunk hozzá, és a mintákat a szövet feloldódásáig 37 °C-on tartottuk. A radioaktivitást Packard folyadékcintillációs számlálóval (Modell 2420) mértük.

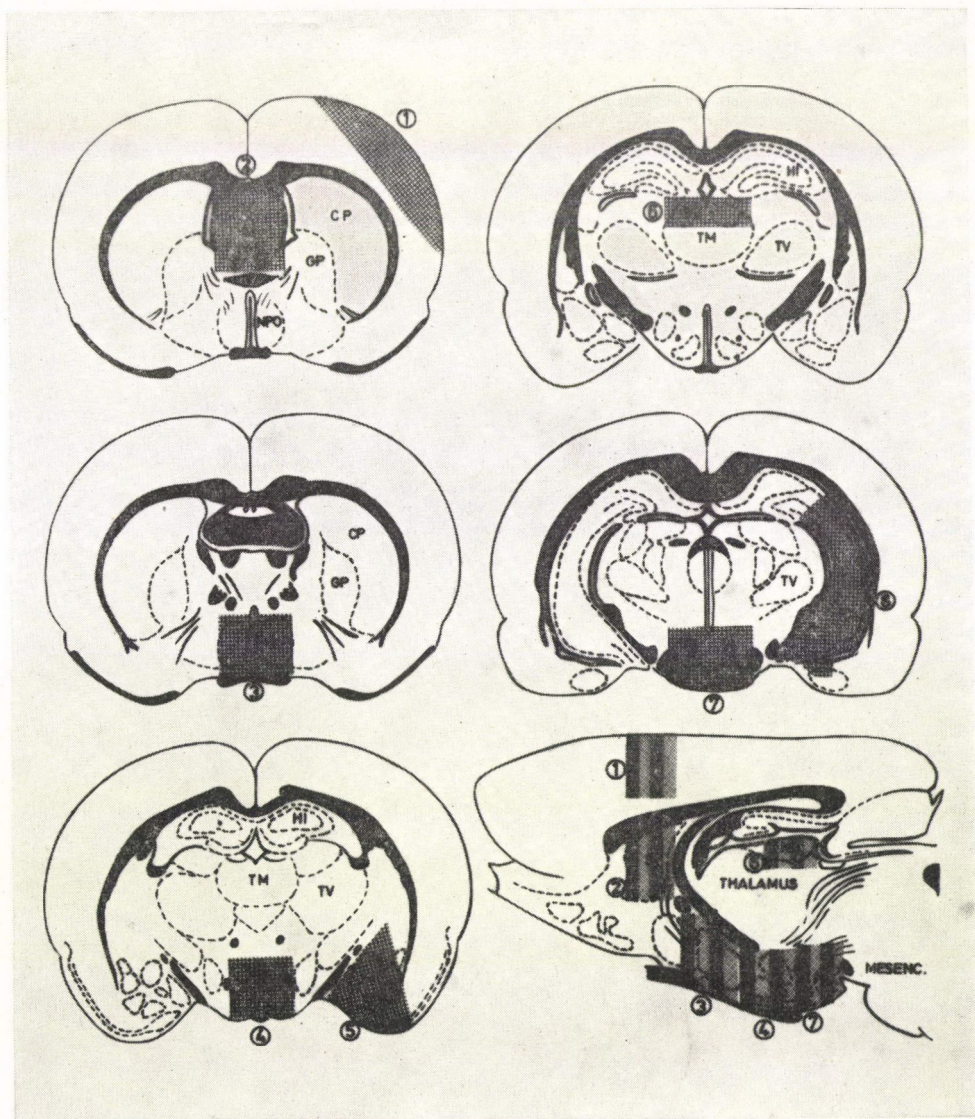
#### *Specifikus kortikoszteron-kötés mérése in vitro* (szaturációs analízis)

Specifikus receptornak csak azt tartják, amely élettani hormonkoncentráción telíthető (Litwack és mtsai, 1972). Ezért kötött kortikoszteronnak azt tekintjük, ami a szaturációs analízis körülményei között a szövetből kizorítható (Sharp és mtsai, 1966; Snart és mtsai, 1970).

Az eljárás menetét az 1. táblázat vázolja. A vizsgálatok előtt 16 órával eltávolítottuk az állatok mellékveséit. Az állatokat leöltük és az agyakat ugyanúgy szeleteltük, mint az in vivo vizsgálatokban (1. ábra). Az adenohipophysist és az egyes agyterületeket feleztük, és két csőbe osztottuk, melyek mindegyike 50–50 ml Krebs–Ringer foszfát puffert (pH 7,35–7,45) tartalmazott. Egy-egy csőpárba 6–6 állatból származó szövet került. Az egyik csőben („A”) a puffert  $2,5 \times 10^{-10}$ – $10^{-9}$  M  $^3\text{H}$ -kortikoszteront, a másikban („B”) az „A” csővel azonos  $^3\text{H}$ -kortikoszteron koncentrációt és  $10^{-6}$  M kortikoszteront tartalmazott.

Hatvan percig, 4 °C-on, állandó keverés mellett inkubáltunk, majd a szövetszeletek felszínét hideg fiziológiás konyhasó oldattal öblítettük, leitatuk és súlyukat megmértük. Éjszakán át, 37 °C-on kloroform : metanol (2:1) eleggyel a szövetből a kortikoszteront extraháltuk, az extraktumot szárazra pároltuk, és mértük  $^3\text{H}$ -kortikoszteron tartalmát.

Ismerve a kötött ( $S_B$ ) és a szabad (S) kortikoszteron mennyiségét a tömeghatás törvényén alapuló függvény segítségével kiszámítható a kortiko-



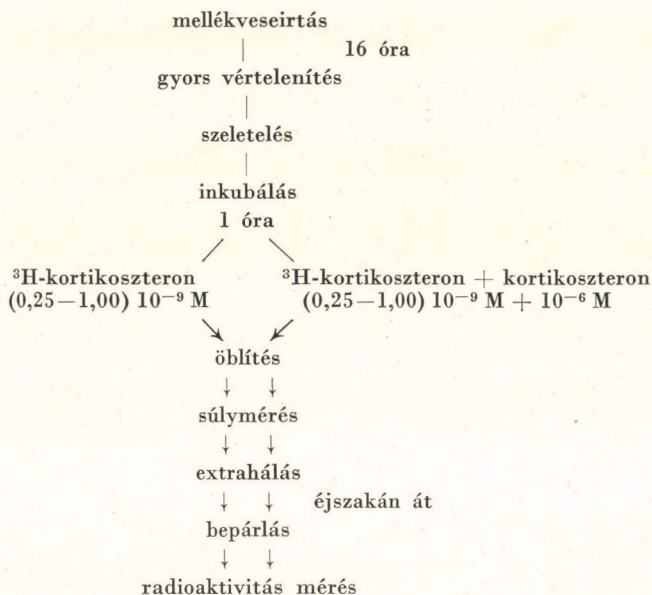
1. ábra. Központi idegrendszeri területek, melyeknek a kortikoszteroid-receptorait vizsgáltuk  
 1. parietális agykéreg; 2. septum; 3. hypothalamus anterior (n. suprachiasmatis, n. anterior hypothalami, n. periventriculáris, n. paraventriculáris); 4. hypothalamus mediális (area retrochiasmatic, n. arcuatus, n. ventromediális, n. dorsomediális, eminentia mediana); 5. amygdala; 6. n. habenulae; 7. hypothalamus posterior (n. premamillaris ventralis, n. premamillaris dorsalis, pars posterior nuclei arcuati, n. posterior hypothalami, corpus mamillare); 8. hippocampus

F: fornix  
 CA: commissura anterior  
 CC: corpus callosum  
 CF: n. caudatus  
 GP: globus pallidum

HI: hippocampus  
 TM: n. thalami medialis  
 TV: n. thalami ventralis  
 NH: n. habenulae  
 NPO: n. preoptici  
 NHA: n. hypothalamicus anterior

## 1. táblázat

*Specifikus kortikoszteron kötés mérése in vitro szaturációs analízissel*



szteron-kötőhelyek száma ( $n$ ) és a receptor-kortikoszteron kötés asszociáció-  
állandója ( $k$ ):

$$S_B = \sum_{i=1}^I \frac{n_i k_i [S]}{1 + k_i [S]}$$

A függvényt a legkisebb négyzetek elve szerinti becslés alapján illesztettük, felhasználva a Newton-féle iterációs eljárást többdimenziós esetben. A számításokat CDC-3300-as számítógépen végeztük.

## Eredmények

In vivo körülmények között vizsgálva a  $^3\text{H}$ -kortikoszteron injekció után két órával minden vizsgált szövet jelentős mennyiségű radioaktivitást tartalmazott, legtöbbit a hypophysis. A radioaktivitás koncentrációja mellékveseirtás után nagyobb volt, mint a kontrollokban, előzetes kortikoszteron adagolás csak a hippocampusban csökkentette (2. táblázat). A többi vizsgált területen a radioaktivitás koncentrációja nagyobb volt, ha az állatok előzőleg nem jelzett kortikoszteront kaptak, mint ha nem kaptak (2. táblázat). Ennek okát további vizsgálatokkal kell tisztázni.

## 2. táblázat

A radioaktivitás koncentrációja a központi idegrendszerben  $^3\text{H}$ -kortikoszteron beadása után két órával  
( $n = 4$ )  
 $\times 10^{-5}$  dpm/g szövet

	Kontroll	Mellékveseirtott	Mellékveseirtott + kortikoszteron
Hypophysis	0,41 $\pm$ 0,08*	1,82 $\pm$ 0,59	2,93 $\pm$ 0,64
Septum	0,16 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,17	1,20 $\pm$ 0,3
Hippocampus	0,17 $\pm$ 0,03	1,39 $\pm$ 0,45	0,80 $\pm$ 0,16**
Hypothalamus anterior	0,16 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,26
Hypothalamus mediális	0,15 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,15	1,27 $\pm$ 0,31
Hypothalamus posterior	0,16 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,11	1,23 $\pm$ 0,32
Amygdala	0,14 $\pm$ 0,06	0,49 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,25
N. habenulae	0,16 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,18
Parietális agykéreg	0,11 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,14	0,74 $\pm$ 0,16

\* Átlag  $\pm$  S. E.

\*\* Alacsonyabb, mint a mellékveseirtott csoportban

In vitro, szaturációs analízissel történt vizsgálatokban a hypothalamus mediális és posterior, a hippocampus, a n. habenulae és a parietális agykéreg jelentős mennyiségű kortikoszteront kötött meg (3. táblázat), a hypophysis, a hypothalamus anterior a septum és az amygdala nem kötötte a kortikoszteront.

## 3. táblázat

Kötött kortikoszteron mennyisége a központi idegrendszerben (in vitro szaturációs analízis)

Szabad kortikoszteron ( $\times 10^{-9}$ M)	Kötött kortikoszteron ( $\times 10^{-9}$ mól/1000 g szövet)				Parietális agykéreg
	hypothalamus		hippocampus	n. habenulae	
	mediális	posterior			
0,25	0,03 $\pm$ 0,03* (8)	0,05 $\pm$ 0,09* (8)	0,13 $\pm$ 0,03 (6)	0,06 $\pm$ 0,05* (7)	0,19 $\pm$ 0,09 (7)
0,50	0,31 $\pm$ 0,05 (5)	0,21 $\pm$ 0,01 (6)	0,33 $\pm$ 0,11 (6)	0,23 $\pm$ 0,05 (4)	0,30 $\pm$ 0,13 (6)
0,75	0,32 $\pm$ 0,06 (13)	0,34 $\pm$ 0,10 (11)	0,47 $\pm$ 0,12 (11)	0,54 $\pm$ 0,16 (10)	0,32 $\pm$ 0,15 (11)
1,00	0,51 $\pm$ 0,10 (10)	0,42 $\pm$ 0,06 (6)	0,49 $\pm$ 0,09 (7)	0,56 $\pm$ 0,14 (8)	0,45 $\pm$ 0,12 (9)

\* Az érték 0-tól nem különbözik

A receptor-kortikoszteron kötés asszociációállandója legkisebb a hypothalamus posteriorban és a n. habenulaeaban, ezeken a területeken a kortikoszteron-kötőhelyek száma nagy (4. táblázat). A hypothalamus mediálisban az asszociációállandó és a kötőhelyek száma megegyezik a parietális agykéregben mért értékekkel, a receptor asszociációállandója a hippocampusban ennél valamivel kisebb (4. táblázat).

## 4. táblázat

*A kortikoszteroid-receptor kötés asszociációállandója és a kötőhelyek száma a központi idegrendszer különböző területein*

	Kötőhelyek száma $\times 10^{-9}$ mó/1000 g szövet	Asszociációállandó ( $\times 10^{-9}$ M <sup>-1</sup> )
Hypothalamus mediális	0,92	0,95
Hypothalamus posterior	520,00	0,0008
Hippocampus	4,40	0,13
N. habenulae	44,60	0,0118
Parietális agykéreg	0,82	1,10

## Megbeszélés

Megegyezően McEwen és mtsai (1969) adataival <sup>3</sup>H-kortikoszteron injekció után valamennyi vizsgált szövet közül a hypophysisben a legnagyobb a radioaktivitás koncentrációja, de ezt a jelzett kortikoszteron előtt adott nem jelzett kortikoszteron nem csökkenti. In vitro kísérleteink szerint a hypophysis nem köti a kortikoszteront. Ha elfogadjuk, hogy a szaturációs analízissel kimutatható receptorhoz történő kötődés a specifikus kortikoszteroid-hatás elengedhetetlen előfeltétele, akkor adataink azt a nézetet támasztják alá, amely szerint a kortikoszteroidok visszajelentő hatásának a hypophysis nem elsődleges helye. Gondolnunk kell azonban arra a lehetőségre is, hogy csak azok a hypophysis-sejtek tartalmaznak kortikoszteroid-receptort, amelyek ACTH-t termelnek. Ezek száma Costoff (1973) szerint az összes hypophysis sejtek 2–4%-a, és ezt a szaturációs analízissel kimutatni nem tudjuk.

A hypothalamusban in vivo vizsgálva McEwen és mtsai (1969) nem találtak kortikoszteron-kötést, és mi sem tudtunk kimutatni a hypothalamus egyik területén sem. In vitro, szaturációs analízissel a hypothalamus mediálisban kimutattunk kortikoszteroid-receptorokat, amelyeknek szerepe lehet a kortikoszteroidok visszajelentő hatásának mechanizmusában. A hippocampusban McEwen és mtsai (1969), valamint Stevens és mtsai (1971) adataival megegyezően kimutattunk in vivo kísérleteinkben kortikoszteron-kötést. In vitro vizsgálataink bizonyították, hogy a hippocampusban a kortikoszteront nagy affinitással kötő receptor van.

A septumban sem in vivo, sem in vitro vizsgálva nem találtunk kortikoszteron-kötést. Ez ellentétben van McEwen és mtsai (1969) adataival.

Minden bizonnyal sejtplazma receptort határoztunk meg, mivel az inkubálást 0 °C-on végeztük, és mert az irodalmi adatok szerint a sejtplazma-receptorokhoz a kortikoszteroidok 0 °C-on is, míg a sejtmag-receptorokhoz csak magasabb (25–37 °C) hőmérsékleten kötődnek (Schaumburg és Bojesen, 1968; Baxter és Tomkins, 1970; Munck és mtsai, 1972).

A sejtplazma-receptorok kortikoszteroid-kötő tulajdonságai in vivo és in vitro azonosak (Stith és Bottoms, 1972a). Az in vivo vizsgálatoknál számos,

nem ellenőrizhető tényező hatásával kell számolni. Elsősorban arra gondolunk, hogy *in vivo* vizsgálva McEwen és mtsai (1969) és saját kísérleteink azért nem mutattak ki kortikoszteron-kötést a hypothalamus mediálisban és a parietális agykéregben, mert ezzel a módszerrel a kötött hormon nem különíthető el a feltehetően jelenlevő lebontási termékétől. Nem tudjuk magyarázni azt a tényt, hogy ennek ellenére a hippocampusban miért mutatható ki kortikoszteroid-kötés *in vivo* vizsgálatainkban is.

A kortikoszteroid-receptornak csak a kortikoszteroidokat nagy affinitással kötő, és a sejten belül élettani körülmények között előforduló hormonkoncentráción telíthető makromolekulákat nevezik (Litwack és mtsai, 1972). A hypothalamus mediálisban, a hippocampusban és a parietális agykéregben kimutatott kortikoszteroid kötés az asszociációállandó és a kötőhelyek száma alapján (4. táblázat) megfelel a receptor ezen kritériumainak. A hypothalamus posteriorban és a n. habenulae-ban a fenti feltételek nem teljesülnek, és így ezeken a területeken mért kortikoszteroid kötés nem tekintjük specifikus receptornak.

A hypothalamus mediálisban és a parietális agykéregben azonos nagyságú asszociációállandót mértünk, mint amit Chytil és Toft (1972) az egész agyból izolált sejtplazma kortikoszteroid-kötésének erősségére meghatároztak. A kortikoszteron kötőhelyek száma a hypothalamusban Stith és Bottoms (1972b) szerint jelentősen több, mint amit mi a patkány hypothalamus mediális sejtjeiben kimutattunk. Ezt az eltérést valószínűleg az okozza, hogy ezek a szerzők egész hypothalamust vizsgáltak, és hogy saját kísérleteink szerint is a hypothalamus posteriorban a kötőhelyek száma igen nagy.

Adataink azt bizonyítják, hogy kortikoszteroid-receptorok vannak a hypothalamus mediálisban és azokban az extrahypothalamikus struktúrákban, amelyek — élettani vizsgálatok szerint — szerepet játszanak az ACTH-elmválasztás szabályozásában.

Az irodalom szerint a hippocampus és a parietális agykéreg ingerlése gátolja, léziójuk fokozza az ACTH-elmválasztást (Porter, 1954; Mason, 1958; Endrőczy és Lissák, 1960; 1962; Knigge, 1960; Mangili és mtsai, 1966; Kawakami és mtsai, 1968a; 1968b). Az ingerlés, ill. lézió az amygdala magcsoportban és a septumban az ACTH-elmválasztást ellentétesen befolyásolja, mint a hippocampusban (Mason, 1959; Endrőczy és Lissák, 1960; Setekleiev és mtsai, 1960; Ganong, 1963; Redgate, 1970; Redgate és Fahringer, 1973).

Kísérleteink azt mutatják, hogy kortikoszteroid-receptor van a hippocampusban és a parietális agykéregben; az amygdalában és a septumban nincs. Ebből arra következtetünk, hogy a hippocampus és a parietális agykéreg — legalábbis részben — kortikoszteroid érzékeny mechanizmus útján hat az ACTH-elmválasztásra, míg az amygdala és a septum más, nem kortikoszteroid érzékeny mechanizmus útján befolyásolhatja azt.

## Összefoglalás

Kortikoszteroid-receptorokat mutattunk ki saturációs analízissel a patkány központi idegrendszerében: a hypothalamus mediálisban, a hippocampusban és a parietális agykéregben. A hypophysisben, a septumban, az amygdalában és a hypothalamus anteriorban kortikoszteroid-kötést nem találtunk. Eredményeink alapot adnak annak feltételezésére, hogy az extrahypothalamikus idegi struktúrák szerepet játszanak a corticoid visszajelentés érzékelésében, ezen keresztül a hypothalamus—hypophysis—mellékvese rendszer működés szabályozásában.

Köszönetünket fejezzük ki dr. Böszörményi Ernőné, Hellferich Frigyesné, Lapis Erzsébet és Seres Rózsa értékes technikai segítségével.

## IRODALOM

- Baxter, J. D. és Tomkins, G. M.: Proc. natn. Acad. Sci. (U. S. A.) 65: 709 (1970).  
 Bohus, B., Nyakas, C. és Lissák, K.: Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 34: 1 (1968).  
 Chytil, F. és Toft, D.: J. Neurochem. 19: 2877 (1972).  
 Corbin, A., Mangili, G., Motta, M. és Martini, L.: Endocrinology 76: 811 (1965).  
 Costoff, A.: Ultrastructure of rat hypophysis. Correlation with function. Acad. Press New York (1973).  
 Davidson, J. M. és Feldman, S.: Acta Endocr. (Kbh) 55: 240 (1967).  
 Dunn, J. és Chrutchlow, V.: Life Sci. 8: 9 (1969).  
 Endrőczy, E. és Lissák, K.: Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 17: 39 (1960).  
 Endrőczy, E. és Lissák, K.: Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 21: 257 (1962).  
 Fleisher, N. és Vale, W.: Endocrinology 83: 1232 (1968).  
 Fortier, C.: In: Harris, G. W.; Donovan, B. T. (Eds.): The pituitary gland Vol. 2. Butterworths, London pp. 195—234 (1966).  
 Ganong, W. F.: In Nalbandov, A. V. (Ed.): Advances in Neuroendocrinology Univ. Illinois Press, pp. 92—157 (1963).  
 Gonzales-Luque, A.: L'Age, M., Dhariwal, A. P. S. és Yates, F. E.: Endocrinology 86: 1134 (1970).  
 Karlson, P.: In: Raspé, G. (Ed.): Advances in the Biosciences 7. Schering Workshop on Steroid Hormone Receptors Pergamon Press pp. 389—392 (1971).  
 Kawakami, M., Sato, K., Tarasawa, E., Yoshida, K., Miyamoto, T., Sekiguchi, M. és Hattori, Y.: Neuroendocrinology 3: 337 (1968a).  
 Kawakami, M., Sato, K., és Yoshida, K.: Neuroendocrinology 3: 349 (1968b).  
 Knigge, K. M.: Fed. Proc. 19. Suppl. 5. 45 (1960).  
 Kraicer, J., Milligan, J. V. és Sinclair, D. G.: Can. J. Physiol. Pharmacol. 50: 164 (1972).  
 Kornel, L.: Acta Endocr. (Kbh) 74. Suppl. 178 (1973).  
 Litwack, G. és Singer, S.: In: Litwack, G. (Ed.): Biochemical Actions of Hormones Vol. 2. Academic Press pp. 114—163 (1972).  
 Litwack, G., Morey, K. S. és Ketterer, B.: In: Rabin, B. R., Freedman, R. B. (Eds.) Effects of drugs on cellular control mechanisms. Univ. Park Press, London pp. 105—130 (1972).  
 Mangili, G., Motta, M. és Martini, L.: In: Martini, L.; Ganong, W. F. (Eds.) Neuroendocrinology Vol. 1. Academic Press pp. 298—370 (1966).  
 Mason, J. W.: In: Jasper, H. H., Proctor, L. D.; Knighton, R. S., Noshay, W. C. és Castello, R. C. (Eds.): The reticular Formation of the Brain Little Brown Co. pp. 645—662 (1958).  
 Mason, J. W.: Amer. J. Physiol. 196: 44 (1959).  
 McEwen, B. S., Weiss, J. M. és Schwartz, L.: Brain Res. 16: 227 (1969).  
 Munch, A., Wira, C., Young, D. A., Mosher, K. M., Hallahan, C. és Bell, P. A.: J. Steroid Biochem. 3: 567 (1972).



- Porter, R. W.: *Recent Progress in Brain Research* 10: 1 (1954).
- Redgate, E. S.: *Endocrinology* 86: 806 (1970).
- Redgate, E. S. és Fahringer, E. E.: *Neuroendocrinology* 12: 334 (1973).
- Sayers, G. és Sayers, M. A.: *Recent Progress in Hormone Research* 2: 81 (1948).
- Schaumburg, B. P. és Bojesen, E.: *Biochim. biophys. Acta* 170: 172 (1968).
- Sharp, G. W. G., Komack, C. L. és Leaf, A.: *J. clin. Invest.* 45: 450 (1966).
- Setekleiev, J., Shang, O. és Kaoda, B. R.: *Acta physiol. Scand.* 50. Suppl. 175. 142 (1960).
- Slusher, M. A.: *Exp. Brain Res.* 1: 184 (1966).
- Snart, R. S., Sanyal, N. N. és Agarwal, M. K.: *J. Endocr.* 47: 149 (1970).
- Stark, E., Gyévai, A., Ács, Zs., Szalay, K. Sz. és Varga, B.: *Neuroendocrinology* 3: 275 (1968).
- Stark, E., Makara, G. B., Marton, J. és Palkovits, M.: *Neuroendocrinology* 19: 224 (1973/74).
- Stevens, W., Grosser, B. I. és Reed, D. J.: *Brain Research* 35: 602 (1971).
- Stiith, R. D. és Bottoms, G. D.: *Gen. Comp. Endocrin.* 19: 386 (1972a).
- Stiith, R. D. és Bottoms, G. D.: *Brain Research* 41: 423 (1972b).
- Yates, F. E., Russel, S. M. és Maran, J. W.: *Ann. Rev. Physiol.* 33: 393 (1971).