

Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos-Barcelona
Sección de Inmunoquímica: J. Gras

Estudio del suero y de la macroglobulina aislada en un caso de macroglobulinemia de Waldenström*

por
J. Gras

(Recibido para publicar el 9 de diciembre de 1957)

La macroglobulinemia, descrita por WALDENSTRÖM en 1948 (16, 17), plantea problemas por una parte de orden nosológico y por otra en relación a las características y naturaleza de las macroglobulinas, que en ellas se encuentran como uno de los signos fundamentales. En este trabajo estudiamos algunas de las características físicoquímicas e inmunológicas del suero y de la macroglobulina aislada, correspondiente a un caso cuyas características clínicas se publican en otro lugar (14), para contribuir al conocimiento de la naturaleza de estas macroglobulinas.

Material y métodos

El suero procede del paciente F. A. (14). El estudio por electroforesis libre y ultracentrifugación lo debemos al Profesor WIEDEMANN, la curva de precipitación por hiposulfito sódico y la electroforesis en papel las hemos obtenido por técnicas ya descritas (5, 6, 7, 8). El estudio inmunológico se ha efectuado obteniendo un antisuero en conejo por inyección subcutánea de la macroglobulina aislada por cuatro precipitacio-

* Este trabajo corresponde, ligeramente modificado, a la comunicación presentada en Montpellier, en 30-v-57, en la sesión conjunta del C. R. Hemat. y Transf. Sang. y la As. de Hemat. de Barcelona.

nes en agua destilada y subsiguiente disolución en suero fisiológico, en dosis de 7,7 a 8,6 mgrs. y a intervalos de 2-3 días. La reacción antígeno-anticuerpo se ha llevado a cabo por la técnica de doble difusión en placas de agar de Ouchterlony (13). La globulina gamma para el estudio de la posible identidad antigénica se ha obtenido por precipitación con el hiposulfito sódico y control electroforético (9) de una mezcla de sueros humanos normales. Para el estudio cromatográfico en papel se utilizó la técnica de PANTANIDA, MENIGA y MUIC (15).

Resultados

El suero del enfermo presenta la reacción de Waldenström del agua destilada positiva intensísima, siendo el primer dato positivo que se obtuvo para el diagnóstico de macroglobulinemia, junto con el cociente de viscosidad/temperatura, que fué de 137,2 (17).

Diluyendo el suero al 1/10 en agua destilada se precipita una proteína, que se redisuelve fácilmente en suero fisiológico.

CUADRO I

Valores del proteinograma en g. %, obtenidos por fraccionamiento con hiposulfito sódico (h) y mediante la electroforesis en papel (e) (v. texto)

		P. T.	Alb.	G. α_1	G. α_2	G. β	G. γ
8-X-1956	h	92,34	32,56	—	6,64	33,70	19,44
8-X-1956	e	93,95	26,74	—	1,09	2,03	64,09
23-X-1956	h	96,49	32,27	—	8,45	32,11	23,66
23-X-1956	e	96,95	31,58	0,77	4,16	0,07	56,37
29-X-1956	e	96,90	33,18	0,25	2,40	2,65	58,42
6-XI-1956	e	84,45	23,74	—	2,21	1,44	57,06
23-XI-1956	e	84,45	21,34	1,85	5,25	4,85	51,16

Repetida esta operación 4 ó 5 veces, se obtiene una globulina que por electroforesis en papel Whatman n.º 1 se comporta homogéneamente como una globulina gamma (fig. 1). En papel más duro y en las mismas condiciones de tampón y paso de corriente esta proteína no se desplaza y queda en el punto de partida. En suero procedente de extracciones posteriores, la redisolución con suero fisiológico después de la segunda precipitación en agua destilada, fué más difícil, y se desnaturizaba con facilidad. Este inconveniente se evitaba practicando



FIG. 1. — Macroglobulina aislada sometida a la electroforesis en papel. Whatmann n.º 1 (a) y Munktell n.º 20 (b), en tampón de veronal sódico pH 8.9 μ 0.06. En el primero se comporta como una globulina gamma y en el segundo no se desplaza del punto de partida.



FIG. 2. — Curva de precipitación con hiposulfito sódico de la macroglobulina aislada. Las flechas indican los puntos de inflexión correspondientes en el suero normal a la precipitación total de la globulina gamma (30.7 g. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) y de la beta (35.5 g. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). La macroglobulina inicia su precipitación en zona correspondiente a la globulina gamma (precipita un 24.7 % de la misma) y termina poco después de pasar al punto de inflexión de la misma. El tipo de curva, sin puntos de inflexión, correspondería a una proteína homogénea.

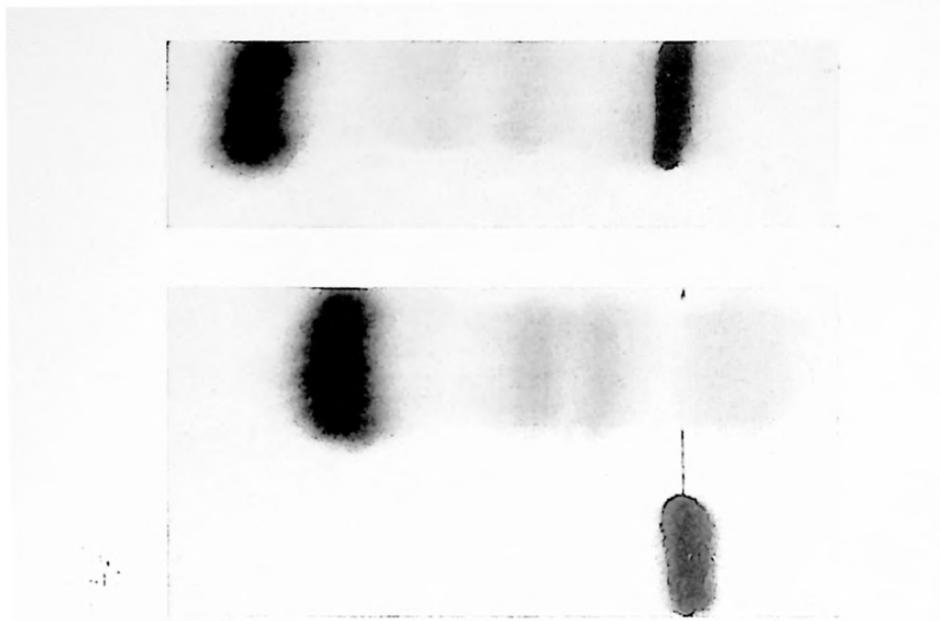


FIG. 3. — Electroforesis en papel (Munktell n.º 20), tampón de veronal (pH 8.6, μ 0.06), del suero con la macroglobulina (a) del suero sin la macroglobulina (b), observándose un contenido de globulina γ más bien bajo y de la macroglobulina aislada (c), en la que se comprueba su persistencia en el punto de partida.

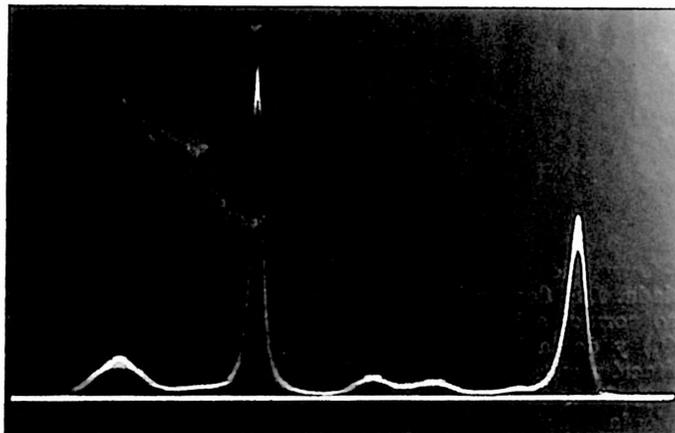


FIG. 4. — Electroforesis libre del suero con la macroglobulina, obtenida por el Profesor WIEDEMANN (diagrama ascendente), aumento de la γ , (45.9 %), con características de homogeneidad que recuerdan las del plasmocitoma. En el diagrama descendente esta homogeneidad es menos marcada.

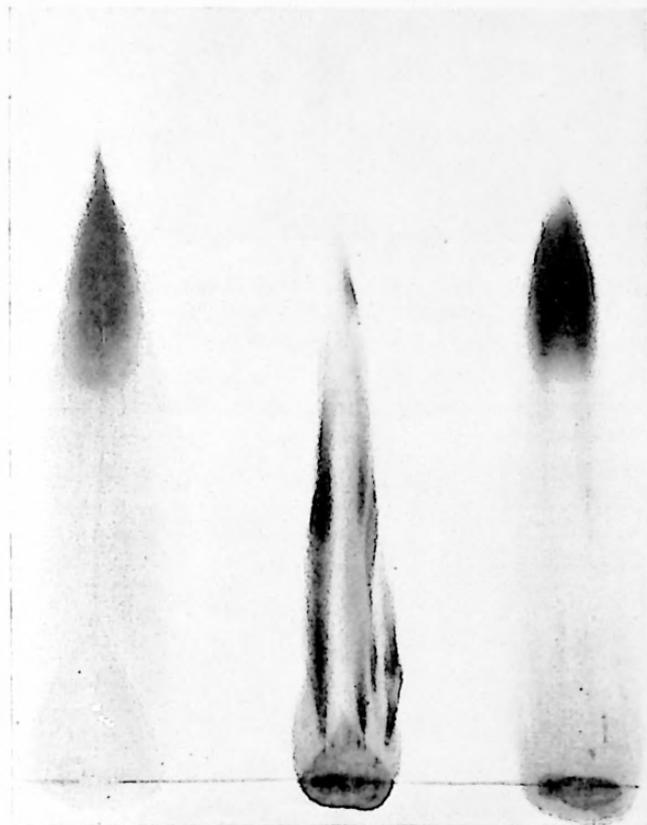


FIG. 5. — Cromatografía ascendente en papel, tampón de citrato a pH 10.1 (15) de una globulina gamma normal (a), de la macroglobulina (b) y de la globulina gamma de un Kala-Azar (c).

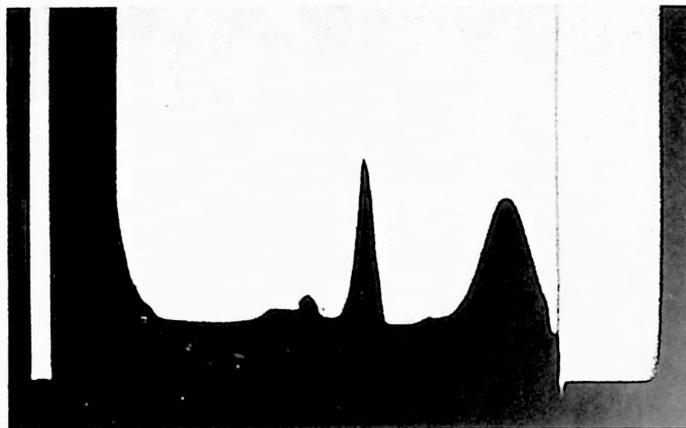
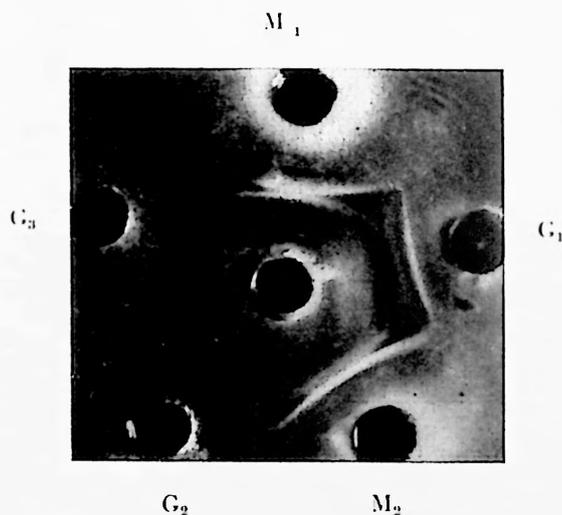


FIG. 6. — Diagrama de ultracentrifugación obtenido por el Profesor WIEDEMANN del suero total, demostrando la existencia de dos macrocomponentes, uno de $S_{20}=18.2$ y el otro de $S_{20}=26.2$.



$M_1 = 0.15$ c. c. sol. macroglobulina ai 16.6 g. 0/00.
 $G_1 = 0.15$ c. c. sol. globulina gamma normal al 16.6 g. 0/00.
 $M_2 = 0.15$ c. c. sol. M_1 al 1/3.
 $G_2 = 0.15$ c. c. col. G_1 al 1/5.
 $G_3 = 0.15$ c. c. sol. G_1 al 1/10.

FIG. 7. — Estudio inmunológico por doble difusión en agar de la macroglobulina aislada (M) y de globulina gamma normal (G) frente a un antisuero antimacroglobulina de conejo. Se observa una reacción de identidad con un antígeno de ambas y reacciones de identidad parcial con otros dos antígenos.

la redisolución a 37°, lo que hace suponer que esta macroglobulina puede tener ciertas características de crioglobulina.

Estudiada la curva de solubilidad en hiposulfito sódico de la macroglobulina aislada se comprueba que se comporta como una proteína homogénea y que su precipitación se inicia antes de la concentración correspondiente al punto de inflexión habitual que señala el fin de la precipitación de la globulina gamma (30,7 g % de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (fig. 2), y su precipitación es casi total a la concentración de 32,5, es decir, mucho antes del punto de inflexión correspondiente a la globulina beta (35,5 g. % de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Es decir, que su curva de precipitación cabalga precisamente en el punto de inflexión de la globulina gamma, en cuyo punto ha precipitado solamente en un 24,7 % y el 75,3 % restante precipita poco más allá de este punto.

De aquí se comprende que al practicar el proteinograma mediante el hiposulfito sódico por la técnica de rutina, se encuentren aumentadas, como después comentaremos, las globulinas gamma y beta, predominantemente esta última. Desde el punto de vista teórico y dado que su precipitación se inicia en la zona de las globulinas gamma y es total poco después de pasado el punto de inflexión correspondiente a las mismas, podría interpretarse con gran probabilidad como si se tratase de una globulina gamma atípica con una curva de precipitación retardada. Esto representaría el caso inverso que ya hemos descrito (9) de un plasmocitoma cuya proteína patológica se comportaba a la electroforesis como una globulina beta, mientras que por el hiposulfito sódico precipitaba totalmente como una globulina gamma, y correspondería a la atipia de las globulinas gamma en estos procesos (7).

Examinado el suero a la electroforesis en papel, utilizando el papel Munktell n.º 20, que es el habitualmente utilizado por nosotros, se observa la presencia de una fracción intensamente teñida que no se desplaza del punto de partida (fig. 3) en el que se ha situado el suero; y que por ello no podría calificarse a qué tipo correspondía electroforéticamente. Practicada la electroforesis en las mismas condiciones pero en papel Whatmann número 1, esta proteína se sitúa algo por detrás del punto de partida, por lo que corresponde a una globulina gamma (fig. 1) con unas características de homogeneidad que recuerdan las de los plasmocitomas. Si la electroforesis se lleva a cabo después de eliminar este componente, por precipitación en agua destilada tal como antes hemos expuesto, se obtiene un diagrama electroforético con un valor de globulina gamma alrededor de los valores normales (fig. 3). La electroforesis libre fué desarrollada por el Prof. WIEDEMANN, quien consideró a esta

fracción como un componente Z o una globulina gamma₁ (fig. 4).

El estudio del proteinograma de este suero mediante la técnica de rutina con hiposulfito sódico, dió un aumento considerable (superior a 25 g. ‰) de globulina beta y de globulina gamma a la vez, hecho que no habíamos observado hasta entonces y que nos indujo a estudiar con más detenimiento el suero. Este comportamiento del fraccionamiento de rutina con hiposulfito sódico viene explicado por el estudio de la curva de precipitación de la macroglobulina aislada que ya hemos expuesto. Clasificada electroforéticamente la fracción anómala de este suero como una globulina gamma, calculamos los valores del proteinograma electroforético que se presentan en el cuadro 1, junto con los obtenidos primeramente con el hiposulfito sódico. Dada la constante identidad entre la globulina precipitada por hiposulfito sódico como globulina gamma y la globulina gamma electroforética, estas discrepancias observadas en este caso y en un caso anterior de plasmocitoma (9), creemos que pueden interpretarse como un dato a favor de la atipia de las globulinas gamma en estos procesos.

Ante el comportamiento que hemos visto a la electroforesis en papel, estudiamos cromatográficamente esta macroglobulina comparativamente a una globulina gamma normal y la de un Kala-Azar (obtenidas por precipitación con hiposulfito sódico), en el tampón de citrato de PANTANIDA, MENIGA y MUIC (15), a pH de 5.1 y 10, por cromatografía ascendente en papel Munktell n.º 20 (fig. 5) se observa claramente como su desplazamiento es más irregular que el de las globulinas gamma, pues se desplaza como a porciones.

El estudio a la ultracentrífuga llevado a cabo por el Profesor WIEDEMANN demostró la existencia de dos macrocomponentes, uno de $S_{20} = 18,2$ y otro de $S_{20} = 26,2$ (fig. 6).

La investigación inmunológica se ha verificado obteniendo un antisuero de conejo por inyecciones de la macroglobulina aislada en dosis de 7,7 a 8,6 mgrs., por vía subcutánea, a intervalos de 2-3 días hasta una dosis total de 306,36 mgrs. (80 días de inmunización). Con este antisuero se llegan a distinguir, por la técnica de doble difusión en agar de Ouchterlony, la existencia de tres antígenos (fig. 7), no tan sólo con este antisuero de hiperinmunización, sino también en el obtenido en una extracción anterior correspondiente a una dosis total de 157,34 miligramos (48 días de inmunización). Con el antisuero más inicial obtenido a los 108,9 mgrs. (30 días de inmunización) se apreciaron solamente dos antígenos.

Con el antisuero de la hiperinmunización estudiamos por doble difusión en agar las posibles reacciones de identidad con la globulina gamma normal aislada por nuestra técnica del

hiposulfito y controlada por la electroforesis. Se comprueba la existencia en ambas de un antígeno que da con toda claridad una reacción de identidad y los otros dos cuyas reacciones son más dudosas, pero que pueden interpretarse como de identidad parcial, puesto que no se cruzan (fig. 7).

Comentario

De las características que acabamos de estudiar de esta macroglobulina destaca su comportamiento a la electroforesis en papel, cuando se practica con un papel duro (Munktell n.º 20), en cuyo caso no se desplaza del punto de partida. Este hecho puede servir como dato de presunción, pues fué uno de los datos que nos llamaron la atención para estudiar con detenimiento las características del suero de este paciente. MACKAY, ERIKSEN, MOLUTSKY y WOLWILER (12) señalan que en sus dos casos este macrocomponente tampoco se desplazaba del punto de partida a la electroforesis en papel. En una de las observaciones de BOUSSER y BOIVIN (2) se ve como la macroglobulina, especialmente la purificada, presenta un desplazamiento anormal a la electroforesis en papel, pues lo hace en forma irregular, a dentelladas. Estudiada cromatográficamente la macroglobulina de nuestro caso, se desplaza en forma muy irregular, también en porciones, comparativamente a una globulina gamma normal y a la de un Kala-Azar, que presentan un desplazamiento uniforme. Creemos que la mejor explicación de estos hechos es la de que se trate de una globulina muy asimétrica, de acuerdo con las observaciones de KRATOCHWIL y DEUTSCH (11), quienes comprueban que su constante de sedimentación a la ultracentrífuga varía con la concentración, por cuyo motivo consideran a los cuatro componentes que encuentran en su macroglobulina cristalizada como moléculas asimétricas.

La macroglobulina aislada de nuestro caso se comportó a la electroforesis en papel (Whatman n.º 1) como una globulina gamma y a la electroforesis libre WIEDEMANN la calificó como un componente Z o una globulina gamma. En la mayoría de casos de la literatura se observa también este comportamiento electroforético y con una característica de homogeneidad que recuerdan las del plasmocitoma. En nuestro caso se comprueba también esta gran homogeneidad electroforética y también en la curva de precipitación con hiposulfito sódico se comporta como una globulina única, pues no aparecen puntos de inflexión en la misma. Por el contrario, a la ultracentrífuga se demostró la existencia en el suero de dos macroglobulinas con constantes de sedimentación de $S_{20} = 18,2$ y $26,2$. Esta homogeneidad

electroforética y de precipitación salina, frente a la demostración de la existencia de dos macrocomponentes en el suero, podría interpretarse, en las condiciones de estudio de nuestro caso, como debida a que sólo precipitase a la dilución en agua destilada uno de los macrocomponentes. Sin embargo, la demostración de su heterogeneidad inmunológica hacen equiparable estas observaciones a las de la macroglobulina cristalizada de KRATOCHWIL y DEUTSCH, la cual presenta también esta característica de homogeneidad electroforética y heterogeneidad a la ultracentrífuga, pues con la misma demuestran la existencia, por lo menos, de cuatro componentes. En uno de los dos casos de MACKAY, ERIKSEN, MOLUTSKY y VOLWILER (12), la macroglobulina presenta dos componentes, tanto a la electroforesis como a la ultracentrífuga. Estos datos sugieren la posibilidad de que los componentes de mayor peso molecular sean polímeros de los de menor peso.

Esta heterogeneidad la hemos comprobado inmunológicamente. Con el antisuero obtenido por inyección de la macroglobulina aislada en las condiciones ya señaladas por precipitaciones repetidas en agua destilada, frente a esta macroglobulina, que se comporta como una proteína homogénea a la electroforesis en papel, y por la curva de precipitación salina, se demostró la existencia de tres antígenos. El antígeno de reacción más intensa, presenta una clara reacción de identidad con uno de los antígenos de la globulina gamma normal, y los otros dos, reacciones más difíciles de interpretar, que parece pueden considerarse como de identidad parcial, pues las líneas de precipitación no llegan a cruzarse en ningún caso. Creemos muy difícil interpretar estos resultados como debidos a impurezas de las soluciones de globulina gamma normal utilizada o de la propia macroglobulina. La solución de macroglobulina ha sido obtenida en unas condiciones en las que el grado de pureza debe ser muy considerable, por lo que no parece pueda interpretarse que esta reacción de identidad del antígeno que da una reacción más intensa con el antisuero anti-macroglobulina corresponda precisamente a una proteína que represente una impureza de las soluciones de globulina gamma y de la macroglobulina. La interpretación más lógica parece pues la de que la macroglobulina tiene el antígeno inmunológicamente más importante (línea de precipitación más intensa y más próxima a los pocillos de antígeno) común con la globulina gamma normal. Aunque así no fuese, lo que sí es forzoso es que el antígeno principal de la macroglobulina sea idéntico con una globulina del suero normal.

Nuestros resultados concuerdan con los de DEUTSCH, MORTON y KRATOCHWIL (4) quienes estudiando varias globulinas

de sueros hiperglobulinémicos, entre ellas la macroglobulina cristalizada, concluyen que son antigénicamente idénticas con las globulinas γ_1 y γ_2 de los sueros normales.

Por el contrario, estos resultados discrepan de los de HABICH y HASSIG (10), pues encontraron que antisueros antimacroglobulina obtenidos en el conejo reaccionan aún con los sueros patológicos que contienen macroglobulina después de ser absorbidos por sueros humanos normales, ante cuyo hecho señalaron la existencia de una especificidad característica de los sueros con macroglobulinemia. Estos hallazgos han sido discutidos por BURTIN, HARTMANN, HEREMANS, SCHEIDEGGER, etcétera (3), basados en el estudio de 26 sueros macroglobulinémicos ya que comprobaron que las macroglobulinas corresponden al aumento de una fracción existente en el suero normal y que identifican mediante la inmunoelectroforesis como una β_2 M-macroglobulina, que no se diferencia inmunológicamente de la de los sueros normales. Las observaciones de HABICH y HASSIG creen posible atribuir las a que el escaso contenido del suero normal en esta macroglobulina no ha sido suficiente para absorber totalmente el antisuero. BOERMA y MANDEMA (1) tampoco encuentran la especificidad inmunológica de proceso, pero sí diferencias individuales entre las distintas macroglobulinas. Sobre estas diferencias individuales no tenemos datos personales, pues sólo hemos podido estudiar la macroglobulina de este caso.

Para la resolución de los problemas nosológicos que esta enfermedad plantea, será interesante aclarar esta disparidad de observaciones. En nuestro caso parece que se trata de una globulina γ atípica como en la macroglobulina cristalizada, estudiada por KRATOCHWIL y DEUTSCH. Esta comprobación está de acuerdo con el hecho que constituye una regla fisiopatológica, de que todas las *grandes hiperproteinemias* lo son por hipergammaglobulinemia, pues las excepciones representadas por los plasmocitomas de β o de α hay razones para suponer que no sean tales excepciones sino de que se trate también de globulinas γ atípicas y que se desplazan más velozmente a la electroforesis, como ya hemos discutido en otra ocasión (7). Los macrocomponentes de la macroglobulinemia podrían ser los resultantes de una polimerización patológica de la globulina γ , en la que ya se conoce la existencia de un tipo con peso molecular de 156.000 y otro de 300.000, aunque ello no niega la existencia de macroglobulinemias discretas debidas al aumento de macroglobulinas con otras características.

* * *

Agradecemos muy sinceramente al Profesor WIEDEMANN, el estudio a la ultracentrífuga y electroforesis libre, pues con ello ha hecho posible este trabajo. A la Dra. M. CUSSET le agradecemos su colaboración en el estudio cromatográfico.

Summary

Study of the serum and its isolated macroglobulin from a case of Waldenström macroglobulinemia

Some characteristics of electrophoresis, saline precipitation and immunology of the serum from a subject with Waldenström's macroglobulinemia, and of the macroglobulin isolated from this one, have been studied. The native serum presents a very intensely positive distillate water test and a viscosity/temperature coefficient of 132.2.

By means of repeated precipitations in distillate water and dissolving again in saline solution, we isolated a globulin which behaves on electrophoresis in soft paper (Whatman nr. 1) like a homogeneous fraction and migrates like a gamma globulin. In hard paper (Munktell nr. 20) it does not move from the initial point (fig. 1). We find this behaviour equally in the native serum (fig. 3). The free electrophoresis was performed by Prof. WIEDEMANN, who identifies the abnormal fraction as a component Z o γ_1 (fig. 4). He also demonstrated with the ultracentrifuge the existence of two macrocomponents with $S_{20} = 18.2$ and 26.2 . The values of the proteinogram by electrophoresis and by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (sodium thiosulphate) (routine method) are indicated in table 1.

The study of the precipitation curve by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (fig. 2) of the isolated macroglobulin demonstrates that it behaves in this aspect like a homogeneous protein. Precipitation begins in the gamma globulin zone, in which precipitates a 24.7 % and ends little after the inflection point, where normally all the gamma globulin precipitates (30.7 g. % of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). This explains why with the routine technic the beta globulin is increased higher than 25 g. %/100, concomitant with an increase equally significative of gamma globulin, a fact we did not observe formerly. Under the theoretic viewpoint we believe that this behaviour can be explained as being due to an atypical gamma globulin with a deferred precipitation curve. This observation would be inverse to that one of a case of plasmocytoma with a pathologic globulin, that behaves electrophoretically like a beta globulin, but precipitates totally like a gamma globulin with sodium thiosulphate (9); in this case it would not

have modified its precipitation curve by sodium thiosulphate, but instead its electrophoretic velocity. Seeing the constant equivalency between the behaviour of a globulin as gamma globulin, as well by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ as by paper electrophoresis, we interpret these observations as a fact favouring the idea of an atypical behaviour of these globulins in that kind of diseases (7).

By ascending paper chromatography in citrate buffer (fig. 5) it presents an anormal migration comparing with normal and kala-azar gamma globulins. Together with its behaviour at electrophoresis in hard paper, it makes us think that they are asymmetric molecules.

Its homogeneity by electrophoresis and saline precipitation contrasts with the existence of two macrocomponents in the native serum.

With an antiserum obtained in rabbits injecting macroglobulin isolated by repeated precipitations in distillate water and by Ouchterlony's double diffusion in agar method, we demonstrated the existence of three antigens. One of them, immunologically the most important, gives an identity reaction with normal gamma globulin (fig. 7) and the other two, reactions explainable as of partial identity. We discuss the possibility of this issue being due to an impurity of macroglobulin and normal gamma globulin, but we consider it very improbable, and think it really depends from the existence of common antigens.

It seems, at least in this case, that this macroglobulin may be a pathologic polymerization of gamma globulin.

Bibliografía

- (1) BOERMA, F. W., y MANDENA, E. : *J. Lab. clin. Med.*, **49**, 358, 1957
- (2) BOUSSER, J., y BOUVIN, P. : *Sangre*, **1**, 233, 1956
- (3) BURTON, P., HARTMANN, L., HEREMANS, J., SCHEIDEGGER, J. J., WESSENDORP-BOERMA, P., WIEME, R., WUNDERLY, C. :, FAUVERT, R., y GRABAR, P. : *Rev. franç. Et. clin. biol.*, **2**, 161, 1957.
- (4) DEUTSCH, H. P., MORTON, J. I., y KRATOCHVIL, C. H. : *J. Biol. Chem.* **222**, 39, 1956.
- (5) GRAS, J. : *R. esp. Fisiol.*, **7**, 265, 1957.
- (6) GRAS, J. : *Laboratorio* **13**, 401, 1952.
- (7) GRAS, J. : *Proteínas plasmáticas*. Ed. Jims. Barcelona, 1956.
- (8) GRAS, J., y SALAZAR, M. : *Laboratorio*, **13**, 201, 1952.
- (9) GRAS, J., y SALAZAR, M. : *Plasma*, **2**, 1, 1954.
- (10) HABICH, H., y HÄSSIG, A. : *Vol Semg*, **3**, 99, 1953.
- (11) KRATOCHVIL, C. H., y DEUTSCH, H. P. : *J. Biol. Chem.*, **222**, 31, 1956.

- (12) MACKAY, I. R., ERIKSEN, N., MOTULSKY, A. G., y VOLWILLER, W. : *Am. J. Med.*, **20**, 564, 1956.
- (13) OUCHTERLONY, O. : *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**, 231, 1952.
- (14) PEDRO-PONS, A., GRAS, J., y PUIGDOLLERS J. M.^a : *Med. clin.* (En prensa.)
- (15) PIANTANIDA, M., MENIGA, A., y MUIC, M. : *Arch. Bioch. Biophys.*, **57**, 334, 1954.
- (16) WALDENSTRÖM, I. : *Schweiz. med. Wschr.*, **76**, 927, 1948.
- (17) WALDENSTRÖM, I. : Abnormal proteins in myeloma. *Adv. Int. Med.*, vol. 5, pág. 398. The Year Book pub. Inc. Chicago, 1952.