

The latter results show that the apoenzyme of tryptophan pyrrolase, localized in the supernatant, is not appreciably damaged in the early stages of 3-Me-4-DAB cancerogenesis. It must be noted that in all cases Mt isolated from cancerogen fed rats show some activating effect, while Ms are completely ineffective. This would suggest a more severe damage of microsomes than of mitochondria.

Similar experiments on supernatant activation were performed with prealably *L*-tryptophan induced tryptophan pyrrolase. Cell fractionation and tryptophan pyrrolase activity determinations were made 5 h after inductors application. The results of these experiments show that addition of Ms and Mt from normal rats increases the tryptophan pyrrolase activity of the S fraction isolated from either control or 3-Me-4-DAB fed rats. On the other hand, Mt and more markedly Ms, isolated from cancerogen fed animals, are almost completely devoid of such activity.

The results reported in this work show that in the early stages of rat liver cancerogenesis induced by 3-Me-4-DAB, liver cell microsomes and mitochondria are damaged in such a way that they lose their tryptophan pyrrolase cofactor. It is possible that lipoprotein membranes of ergastoplasm (microsomes) and mitochondria are the first cellular structures damaged by the cancerogen. This

damage determines subsequent changes in the permeability of cytoplasmic structures as revealed by changes in swelling^{13,14} and loss of cofactors¹⁵. Our results are consistent with the representation that structural damage to ergastoplasm and mitochondria is the cause of the metabolic changes in cancerogenesis.

Résumé. L'ingestion du cancérigène 3-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène pendant 40 jours inhibe fortement l'induction de la tryptophane pyrrolase du foie des rats causée par le *L*-tryptophane ou bien l'hydrocortisone. Les auteurs montrent que cet effet est dû à la perte du cofacteur de la tryptophane pyrrolase des mitochondries et des microsomes des animaux soumis au régime alimentaire cancérigène.

A. A. HADJIOLOV and M. D. DABEVA

Department of Biochemistry, Higher Medical Institute, Sofia (Bulgaria), March 27, 1961.

¹³ J. C. ARCOS and M. ARCOS, *Biochim. biophys. Acta* 28, 9 (1958).

¹⁴ J. C. ARCOS, G. W. GRIFFITH, and R. W. CUNNINGHAM, *J. biophys. biochem. Cytol.* 7, 49 (1960).

¹⁵ S. WEINHOUSE, *Adv. Cancer Res.* 3, 269 (1955).

Das Coenzym A in leukämischem Blut

Im Blut von leukämischen Individuen, vor allem in solchen mit myeloischer Leukämie, wurde eine Erhöhung der Sulfonamid- und Paraminobenzoesäure-acetylierenden Wirkung festgestellt, die sowohl *in vitro*¹ als auch *in vivo*² nachweisbar war. Es schien interessant, den Gehalt von Coenzym A im Blut von leukämischen und normalen Personen zu bestimmen, um festzustellen, ob man bei den ersteren eine der acetylierenden Wirkung entsprechende Erhöhung erhielt. Eine vorläufige Mitteilung über dieses Problem wurde von uns schon veröffentlicht³. Weitere Untersuchungen wurden zur Bestätigung, ob die Zunahme des Coenzym-A-Gehaltes vorwiegend im Plasma oder in den Blutkörperchen und in einer besonderen Gruppe derselben stattfindet, unternommen.

Die Bestimmung von Coenzym A wurde mikrobiologisch mit *Lactobacillus arabinosus* 17-5 nach Abspaltung des gebundenen Pantethins durch alkalische Phosphatase^{3,4} durchgeführt. Wir untersuchten 8 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, 4 mit chronischer lymphatischer Leukämie und 2 mit subakuter Retotheliose. Zum Vergleich wurde das Blut von 11 gesunden Individuen untersucht.

Die Ergebnisse der Coenzym A-Bestimmungen (Mittelwerte der verschiedenen Gruppen) sind in Tabelle I zusammengestellt. Das Vorhandensein eines höheren Coenzym A-Gehaltes im Blut von leukämischen Personen, im Vergleich zu demjenigen von Normalen und Kranken mit anderen Leukämieformen ist deutlich. Ein Vergleich des Coenzym A-Gehaltes im Vollblut, Plasma und Blutzellenanteil (durch Zentrifugieren erhalten) zeigte, dass die grösste Menge des Coenzym A in den Blutkörperchen enthalten ist (Tabelle II). Der Anteil von Coenzym A im Plasma, sei es bei normalen oder bei leukämischen Subjekten, erwies sich als niedriger als derjenige im Vollblut, gelegentlich mag das Plasma mit Thrombozyten verunreinigt gewesen sein.

Die Trennung der Leucozyten, durchsetzt mit einer gewissen Anzahl von Thrombozyten, mittels Differenzial-zentrifugation erlaubte festzustellen, dass der grösste An-

teil von Coenzym A in diesen Elementen und nicht in den roten Blutkörperchen enthalten ist. Zusatz einer aus dem Vollblut abzentrifugierten gleichen Anzahl von Leucozyten zum Plasma führte zu Coenzym A-Werten in derselben Höhe wie beim Gesamtblut und eine weitere Zugabe von Leucozyten zu einer proportionalen Erhöhung des Coenzym A-Gehaltes. Es war nicht möglich, eine Korrelation zwischen der Anzahl der Leucozyten oder besonderer Formen derselben und der Höhe des Coenzym A-Gehaltes des Blutes nachzuweisen.

Tab. I. Mittel aus den Mittelwerten der einzelnen Fälle

	Fälle	Anzahl der Bestimmungen	γ CoA/ml	t-Test (I→) <i>p</i>
I Normale	11	11	$1,52 \pm 0,38$	
II Leukämien	14	22	$5,29 \pm 0,63$	< 0,001
II a Myelämien	8	14	$6,89 \pm 0,55$	< 0,001
II b andere Leukämien	6	8	$3,15 \pm 0,55$	< 0,05

Tab. II. Coenzym A-Gehalt in γ /ml

	Gesamtblut	Plasma
Leukämien	7,80	3,40
Normalblut	2,48	1,35

¹ G. SALVI, U. AMBANELLI, G. ROSATI und R. STARCICH, *Haematologica* (Pavia) 43, 1051 (1958).

² U. AMBANELLI, G. SALVI und R. STARCICH, *Sangre* 2, 213 (1957).

³ U. AMBANELLI, F. BONATI und G. SALVI, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 35, 2100 (1959).

⁴ Wir danken RAETIA ZUERN für die Durchführung der mikrobiologischen Bestimmungen.

Hingegen besteht eine Korrelation zwischen der acetylierenden Wirkung⁵ und dem im Blut enthaltenen Coenzym A. Aus einer Gruppe von 28 Untersuchungen erhält man einen Korrelationskoeffizienten von $r = +0,6244$ ($P \sim 0,001$). Diese Untersuchungen lassen uns zum Schluss kommen, dass das im Blut vorhandene Coenzym A zum grössten Teil in den Leukozyten und vielleicht auch in den Thrombozyten enthalten ist; hingegen ist der Gehalt im Plasma und in den Erythrozyten niedrig.

Diese Befunde stehen vielleicht in Beziehung zu kürzlich veröffentlichten Untersuchungen, wonach die Synthese der Lipide – ein Vorgang, in welchem das Coenzym A eine erste Rolle spielt – im zirkulierenden Blut vorwiegend in den Leukozyten und in geringerem Grade in den Thrombozyten stattfindet, während sie in den reifen Erythrozyten und im Plasma fast ganz fehlt^{6,7}.

Riassunto. Il Coenzima A nel sangue di soggetti leucemici, in particolare con leucemia mieloide, appare nettamente aumentato in confronto al sangue normale.

Il Coenzima A è contenuto in prevalenza nei leucociti e probabilmente anche nelle piastrine, mentre è scarso nel plasma e nei globuli rossi.

U. AMBANELLI, F. BONATI und G. SALVI

Istituto di Clinica Medica della Università di Parma und Laboratori Ricerche della Bracco Ind. Chimica, Milano (Italien), 18. Mai 1961.

⁵ μ g von acetyliertem PABA während 24 h in 1 ml Blut bei 37°.

⁶ P. MARKS, A. GELLHORN und C. KIDSON, *J. biol. Chem.* **235**, 2579 (1960).

⁷ E. ROWE, A. ALLISON und J. LOVELOCK, *Biochim. biophys. Acta* **41**, 310 (1960).

C16-Methyl Derivatives of Progesterone and 17 α -Acetoxypregesterone: Preparation and Biological Activities

In view of the recent publication¹ describing the preparation of certain C16-methyl steroids, we wish to report here the progestational activities associated with several derivatives of 16 α -methylprogesterone prepared in these Laboratories.

In Table I are given the comparative biological activities of 16 α -methylprogesterone² (I) and its 2 α -methyl (II)-, 6 α -methyl (III)³- and 6 α -fluoro (IV)-derivatives. Also included are the physical properties of the newly prepared compounds II and IV. 2 α ,16 α -Dimethylprogesterone (II) was obtained by alkylation⁴ of the C2-glyoxylic ester of 16 α -methylprogesterone (I). 6 α -Fluoro-16 α -methylprogesterone was prepared by employing either the epoxide-hydrofluoric acid⁵ or the N-bromoacetamide-hydrofluoric acid⁶ techniques for the introduction of the C6-fluorine

atom, each utilizing 16 α -methylpregnenolone² as starting material.

Summarized in Table II are the biological activities and physical properties of the 16 α -methyl derivatives of 17 α -hydroxypregesterone. 16 α -Methyl-17 α -hydroxypregester-

¹ E. BATRES, T. CARDENAS, J. A. EDWARDS, G. MONROY, O. MANCERA, C. DJERASSI, and H. J. RINGOLD, *J. org. Chem.* **26**, 871 (1961).

² R. E. MARKER and H. M. CROOKS Jr., *J. Amer. chem. Soc.* **64**, 1280 (1942).

³ S. BERNSTEIN, E. W. CANTRALL, and J. P. DUSZA, *J. org. Chem.* **26**, 269 (1961).

⁴ J. A. HOGG, F. H. LINCOLN, R. W. JACKSON, and W. J. SCHNEIDER, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 6401 (1955).

⁵ J. A. HOGG, G. B. SPERO, J. L. THOMPSON, B. J. MAGERLEIN, W. P. SCHNEIDER, D. H. PETERSON, O. K. SEBEK, H. C. MURRAY, J. C. BABCOCK, R. L. PEDERSON, and J. A. CAMPBELL, *Chem. and Ind.* **1958**, 1002.

⁶ A. BOWERS, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 4107 (1959).

Tab. I. Subcutaneous progestational activity – Clauberg assay^a

Compound	M.P. °C	$[\alpha]_D$ (CHCl ₃)	$\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ m μ (e)	Approx. activity (Progesterone = 1)
16 α -Methylprogesterone (I)	135–138.5	+ 160°	240 (16900)	1
2 α ,16 α -Dimethylprogesterone (II) ^b	151–152	+ 169°	240 (14800)	inactive ^c
6 α ,16 α -Dimethylprogesterone (III)	113–116.5	+ 145°	242 (16100)	1
6 α -Fluoro-16 α -methylprogesterone (IV)	144–146	+ 18°	236 (14900)	1

^a Assays were performed by the Endocrine Laboratories, Madison (Wisconsin, U.S.A.) and the MacPhail modification of the Clauberg assay was used. ^b All new compounds recorded therein have been satisfactorily characterized by elemental analysis. ^c i.e. at a 1 mg total dose level.

Tab. II. Oral progestational activity – Clauberg assay^a

Compound	M.P. °C	$[\alpha]_D$ (CHCl ₃)	$\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ m μ (e)	Approx. activity (17 α -Acetoxypregesterone = 1)
16 α -Methyl-17 α -hydroxypregesterone (V) ^b	180–183.5	+ 86°	242 (17200)	inactive ^c
16 α -Methyl-17 α -acetoxypregesterone (VI)	233–236	+ 80°	242 (15200)	1
16 α -Methyl-6-dehydro-17 α -acetoxypregesterone (VII)	212–214	+ 15°	283 (26100)	15
16 α -Methyl-1-dehydro-17 α -acetoxypregesterone (VIII)	227–228	+ 30°	244 (15000)	8
16 α -Methyl-1,6-bisdehydro-17 α -acetoxypregesterone (IX)	213–214	– 18°	221 (13900) 257 (12100) 299 (14000)	66

^a See Table I, footnote ^a. ^b See Table I, footnote ^b. ^c i.e. at a 1 mg total dose level.