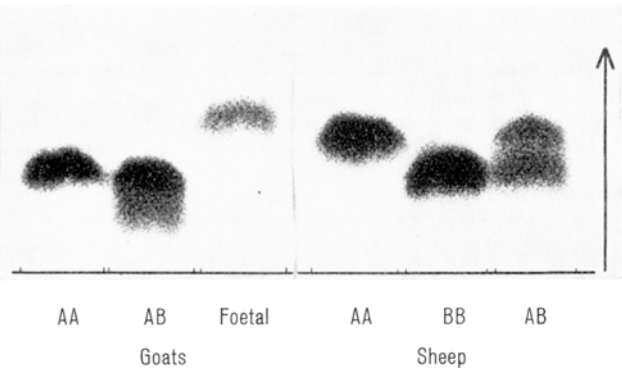


Studies on Haemoglobin Variants and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Indian Sheep and Goats

Recently we undertook an investigation on the distribution of haemoglobin variants and the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in Indian sheep and goats. Animals of one to three years of age were selected for this study. Paper electrophoresis for the separation of haemoglobin variants was carried out by the method of SMITH and CONLEY<sup>1</sup>. Glucose-6-phosphate dehydrogenase was determined by the screening technique of MOTULSKY and CAMPBELL<sup>2</sup> as well as by the quantitative technique of MARKS<sup>3</sup>. The Figure shows the haemoglobin patterns in sheep and goat. The analysis of the genotype distribution of haemoglobin variants is detailed in the Table.



Distribution of two haemoglobin variants in Indian sheep and goats

| Species | No. tested | Haemoglobin |    |     | Gene frequency |       |
|---------|------------|-------------|----|-----|----------------|-------|
|         |            | AA          | AB | BB  | Hb-A           | Hb-B  |
| Sheep   | 100        | 4           | 19 | 77  | 0.135          | 0.865 |
| Goat    | 100        | 85          | 15 | Nil | 0.925          | 0.075 |

As shown by earlier workers<sup>4-6</sup>, Indian sheep and goats also possess two haemoglobin variants. The frequency of gene Hb-A (0.135) in sheep is lower than gene Hb-B (0.865). These frequencies are comparable with those of Leicester breed<sup>4</sup> and Dutch stock<sup>6</sup>. EVANS et al.<sup>4</sup> have also reported a higher frequency of Hb-A (61%) in Scottish Blackface sheep. The preponderance of Hb-A and its greater affinity to oxygen have been shown to be characteristic of sheep stock of higher altitudes<sup>6</sup>. Present findings of lower frequency of Hb-A in low altitude Indian sheep stock are in agreement with these observations.

Indian goats have a lower frequency of Hb-B. No homozygous BB was detected in one hundred samples which were investigated. Foetal haemoglobin of goats has a faster mobility than the two adult variants. Blood samples from sixty sheep and forty goats investigated for G6PD showed complete absence of this enzyme, which was otherwise present in other species like buffalo, cattle, dog, horse and rabbit (unpublished observation). The absence of G6PD in sheep and goats has great importance in view of the key role this enzyme plays in carbohydrate metabolism. Whether the alternate pathways involving higher transketolase (TK) and transaldolase (TA) activities demonstrated by BONSIGNORE et al.<sup>7</sup> in the G6PD deficient people exists in the erythrocytes of Indian sheep and goats, would be worth investigating. The studies on the deficiency of G6PD in sheep and goats and its possible relationship to greater resistance to trypanosome infection<sup>8</sup> would be significant in light of the reported resistance of the G6PD deficient human beings to malarial parasites<sup>9,10</sup>.

**Résumé.** Deux variantes d'hémoglobine Hb-A et Hb-B ont été démontrées chez le bouc et le mouton Indiens. Les fréquences génétiques pour Hb-A et Hb-B sont respectivement 0.135 et 0.865. Le fervent déhydrogénase de glucose-6-phosphate chez les érythrocytes de bouc et de mouton est absent. Nous avons employé la méthode semi-quantitative de MOTULSKY pour la détermination de l'activité de déhydrogénase de glucose-6-phosphate.

V. R. KHANOLKAR, S. N. NAIK,  
A. J. BAXI, and H. M. BHATIA

Human Variation Department and Blood Group Reference Centre, Indian Cancer Research Centre, Parel, Bombay (India), March 15, 1963.

<sup>1</sup> E. W. SMITH and C. L. CONLEY, *Bull. John Hopkins Hosp.* 93 94 (1953).  
<sup>2</sup> A. G. MOTULSKY and J. M. CAMPBELL, *Blood*, in press (1962).  
<sup>3</sup> P. A. MARKS, *Science* 127, 1338 (1958).  
<sup>4</sup> J. V. EVANS, H. HARRIS, and F. L. WARREN, *Biochem. J.* 65, XLII (1957).  
<sup>5</sup> H. J. VAN DER HELM, G. VAN VLIET, and T. H. J. HUISMAN, *Biochem. J.* 72, 331 (1957).  
<sup>6</sup> T. H. J. HUISMAN, H. J. VAN DER HELM, H. K. A. VISSER, and G. VAN VLIET, *Symposium on Abnormal Haemoglobin* (Blackwell Scientific Publication, 1959), p. 181.  
<sup>7</sup> A. BONSIGNORE, G. FORNAINI, G. SEGNI, and A. SEITUN, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 4, 147 (1961).  
<sup>8</sup> U. F. RICHARDSON and S. B. KENDALL, *Veterinary Protozoology* (Oliver & Boyd, London 1957), p. 42.  
<sup>9</sup> A. G. MOTULSKY, *Human Biol.* 32, 28 (1960).  
<sup>10</sup> *Acknowledgment.* Our grateful thanks are due to Dr. PENDSE and Dr. DABHOLKAR for their kind co-operation in the collection of blood samples from the Municipal Slaughter House, Bandra, Bombay.

Über das Glukuronsäurekonjugat eines Cardenolidgenins (3-Epi-digitoxigenin)

In vorangegangenen Arbeiten über die Biotransformation von Digitoxin und Digitoxigenin bei der Ratte ist berichtet worden, dass das intermediär gebildete 3-Epi-digitoxigenin mit Glukuronsäure konjugiert wird<sup>1,2</sup>. Das 3-Epi-digitoxigenin-glukuronid wurde damals<sup>2</sup> irrtümlich

als eine chloroformlösliche Verbindung mit einem R<sub>Digitoxigenin</sub>-Wert von 0,26 (Papierchromatographie im

<sup>1</sup> K. REPKE und F. LAUTERBACH, *Verh. Dtsch. Ges. Kreislauff.* 25, 290 (1959).  
<sup>2</sup> F. LAUTERBACH und K. REPKE, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 239, 196 (1960).

System Xylol-Methyläthylketon (1:1)/Formamid<sup>3</sup>, absteigend) bezeichnet. Während dieser chloroformlösliche Metabolit erst in einer späteren Mitteilung näher charakterisiert werden soll, beschreiben wir hier Isolierung und Verhalten des chloroformunlöslichen 3-Epi-digitoxigenin-glukuronids.

Zur Darstellung wird Digitoxigenin mit Schnitten aus Leber vom Menschen (frisches Operationsmaterial), Kaninchen oder (mit besonders guten Ausbeuten) vom Hund inkubiert (zur Methodik vgl.<sup>2</sup>). Das Inkubat wird (nach Homogenisieren) zunächst mit Chloroform extrahiert. Anschliessend wird aus der wässrigen Phase das Eiweiss durch Zusatz von Äthanol (1:4) und 15stündige Aufbewahrung bei 0°C gefällt und danach durch Zentrifugieren entfernt. Nach Vertreiben des Alkohols im Vakuum wird die resultierende Lösung mit Ammoniumsulfat versetzt (50 g/100 ml) und mit Äther-Äthanol (3:1)<sup>4</sup> erschöpfend extrahiert. Im letzteren Extrakt werden bei papierchromatographischer Auftrennung im System *n*-Butanol: 2*n* wässriges Ammoniumhydroxyd (1:1)<sup>5</sup> verschiedene hochpolare Metaboliten gefunden, wobei sich Speciesunterschiede in bezug auf Vorkommen oder Menge der einzelnen Produkte zeigen (Figur 1). Die Metaboliten 1–5 zeigen nach Behandeln mit Trichloressigsäure-‘Chloramin’ und Erhitzen<sup>3</sup> eine gelbe Fluoreszenz im UV-Licht und bilden nach Besprühen mit Lösungen von *m*-Dinitrobenzol und Natronlauge<sup>6</sup> ohne Erhitzen eine blauviolette Farbe, womit die Unversehrtheit des Butenolidrings bei diesen Stoffwechselprodukten erwiesen ist.

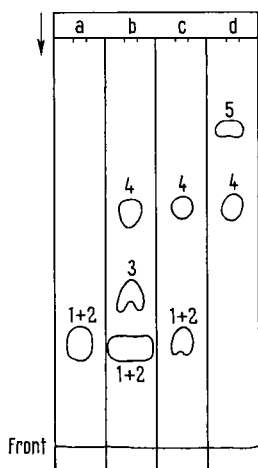


Fig. 1. Papierchromatographisches Verhalten (*n*-Butanol: 2*n* wässriges Ammoniumhydroxyd = 1:1<sup>5</sup>, absteigend, 15 h) der mit Äther-Äthanol (3:1) extrahierten Metaboliten, die bei Inkubation von Digitoxigenin mit Schnitten aus Leber von Mensch (b), Kaninchen (c) oder Hund (d) gebildet werden. Auf Bahn a sind die fermentativ bereiteten<sup>8</sup> Schwefelsäure-Ester des Digitoxigenins und 3-Epi-digitoxigenins aufgetragen (maßstabgerechte Umzeichnung).

Bei der Chromatographie des Äther-Äthanolextrakts an  $\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>7</sup> erscheinen die Substanzen 1–3 in der Sulfatfraktion und die Metaboliten 4 und 5 in der Glukuronidfraktion. Die Substanzen 1 und 2 sind schon als Schwefelsäureester des Digitoxigenins oder 3-Epi-digitoxigenins identifiziert worden<sup>8,9</sup>. – Nr. 3 enthält nach dem Rhodizonat-Test<sup>10</sup> kein Sulfat und bleibt bei einstündiger Solvolyse in Dioxan-Trichloressigsäure<sup>11</sup> ungespalten. Wenn dieser Metabolit ein Schwefelsäurekonjugat sein sollte (wie dies sein chromatographisches Verhalten nahelegt), dann muss es sich um einen besonders schwer spaltbaren

Ester handeln. – Die Substanz 5, die sich gleichfalls nicht solvolysieren<sup>11</sup> lässt, wird auch durch Inkubation (48 h bei 37°C) mit 1400 Fishman-Einheiten  $\beta$ -Glukuronidase (aus Leber vom Rind; Hersteller: Schering AG, Berlin West) bei pH 4.6 nicht gespalten. Trotzdem kann es sich (wie das chromatographische Verhalten vermuten lässt) um ein Glukuronsäurekonjugat handeln, da die  $\beta$ -Glukuronidase nicht alle Glukuronide spaltet<sup>12</sup>.

Der Metabolit 4 erscheint bei der Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  in der Glukuronidfraktion und verhält sich auch bei der Verteilungschromatographie auf Papier im System Butanol: 2*n*  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 1:1<sup>5</sup> mit  $R_f$  = 0.43 wie die Glukuronsäure-Konjugate von Steroidhormonen<sup>5</sup>. Bei der Chromatographie im System Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) lässt sich der Metabolit 4 ( $R_f$  = 0.82) leicht von Glukuronsäure ( $R_f$  = 0.21) und dessen Lakton ( $R_f$  = 0.42) unterscheiden (Figur 2). Die Substanz lässt sich nicht solvolysieren<sup>11</sup> und wird auch nicht gespalten durch eine 48stündige Aufbewahrung in 0,025*M* Acetatpuffer pH 4,6 bei 37°C. Dagegen findet sich nach sonst gleichartiger Inkubation mit sulfatasefreier  $\beta$ -Glukuronidase (1400 E des obengenannten Präparats) im Chloroformextrakt ein freies Cardenolidderivat. Dieses Spaltprodukt verhält sich bei der papierchromatographischen Analyse im System Xylol-Methyläthylketon (4:1)/Formamid<sup>3</sup> wie authentisches 3-Epi-digitoxigenin ( $R_{\text{Digitoxigenin}}$  = 0,82). Dagegen tritt Digitoxigenin als Spaltprodukt von Metabolit 4 nicht auf. Dass nur 3-Epi-digitoxigenin (3 $\alpha$ ,14 $\beta$ -Dioxy-

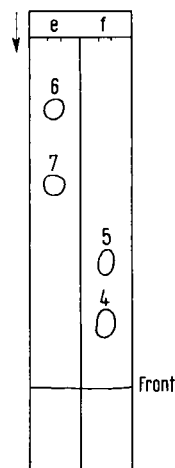


Fig. 2. Papierchromatographisches Verhalten (*n*-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:2, absteigend, 20 h) der in der Glukuronidfraktion gefundenen Metaboliten 4 und 5 im Vergleich zu authentischer Glukuronsäure (Nr. 6) und dessen Lakton (Nr. 7).

<sup>3</sup> F. KAISER, Chem. Ber. 88, 556 (1955).

<sup>4</sup> R. W. H. EDWARDS, A. E. KELLIE und A. P. WADE, Mem. Soc. Endocrin. 2, 53 (1953).

<sup>5</sup> J. E. BUSH, Biochem. J. 67, 23 P (1957).

<sup>6</sup> O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 34, 108 (1951).

<sup>7</sup> K. SCHUBERT und G. HOBE, Z. physiol. Chem. 323, 264 (1961).

<sup>8</sup> I. HERRMANN und K. REPKE, Arch. exp. Path. Pharmacol. 243, 333 (1962).

<sup>9</sup> I. HERRMANN und K. REPKE, Mber. Dt. Akad. Wiss. 5, 140 (1963).

<sup>10</sup> J. J. SCHNEIDER und M. L. LEWBART, J. biol. Chem. 222, 787 (1956).

<sup>11</sup> S. L. COHEN und I. B. ONESON, J. biol. Chem. 204, 245 (1953).

<sup>12</sup> K.-D. VOIGT, M. LEMMER und J. TAMM, Biochem. Z. 332, 550 (1960).

carden-(20:22)-olid) als Steroidkomponente im Conjugat 4 vorkommt, spricht gleichfalls für Glukuronsäure als Conjuganden, weil die Glukuronyl-Transferase offenbar nur mit  $\alpha$ -ständigen OH-Gruppen an C-3 von A/B *cis*-Steroiden reagiert (erschlossen aus dem ausschliesslichen Vorkommen der entsprechenden Metabolite von Steroidhormonen<sup>13</sup>).

Die Beobachtungen insgesamt erlauben den Schluss, dass der Metabolit 4 mit 3-Epi-digitoxigenin-glukuronid identisch ist. Vermutlich werden im tierischen Organismus auch andere Cardenolidgenine, die durch Epimerisierung entgiftet werden können<sup>14</sup>, über anschliessende Konjugation mit Glukuronsäure ausscheidungsfähig gemacht.

**Summary.** After incubation of digitoxigenin with slices from livers of man, rabbit or dog, a total of 5 chloroform-insoluble, highly polar metabolites has been isolated by

extraction with ether-ethanol. Two of the products were the sulfuric acid esters of digitoxigenin or 3-epi-digitoxigenin, as demonstrated earlier, and two further ones could not be identified. The fifth metabolite appeared to be identical with 3-epi-digitoxigenin glucuronide.

I. HERRMANN und K. REPKE

*Institute für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Biochemie, Berlin-Buch (DDR), 30. April 1963.*

<sup>13</sup> R. REUBER und J. SCHMIDT-THOMÉ, in HOPPE-SEYLER/THIERFELDERS *Handbuch der pathologisch- und physiologisch-chemischen Analyse*, 10. Auflage (Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955), Bd. III/2, p. 1451.

<sup>14</sup> K. REPKE, Proc. First Intern. Pharm. Meeting, Stockholm 1961 (Pergamon Press, Oxford 1963), vol. III, p. 47.

### Absorption and Excretion of Benzpyrene in the Cockroach (*Periplaneta americana*)<sup>1</sup>

We have reported<sup>2</sup> that the skin and viscera of chickens and mice have a blue fluorescence following the oral administration of benzpyrene. Benzpyrene is present in the blood of chickens and ducks and in the bile of chickens and dogs thus treated. According to WILLIAMS<sup>3</sup>, this blue fluorescence may result either from benzpyrene or one of its metabolites. CHAMBERS and KIRBY<sup>4</sup> and KOTIN et al.<sup>5</sup> found that benzpyrene and its metabolites are normally eliminated through the liver and kidney. In our present study of absorption and elimination of benzpyrene in the cockroach, the benzpyrene was added to the food. Fluorescence was observed with ultraviolet light and benzpyrene was extracted from the tissues.

**Methods and Material.** Adult cockroaches (*Periplaneta americana*) were caught locally and put into large glass jars. Laboratory chow was used as food, the pellets being crushed and put on the bottom of the jars. Water was available in small containers. Crystals of benzpyrene were added to the crushed pellets of laboratory chow in concentrations of 1, 5, 10, and 20 mg of benzpyrene per g of food. This food was again molded into pellets weighing 1 to 2 g and dried in an oven for 24 h at 78°C.

The length of time the roaches were fed the benzpyrene-containing food varied from 24 h to 2 months. In some experiments the roaches were fed benzpyrene-containing food for 24 h and then normal laboratory chow for varying periods. Some of the roaches were kept in individual jars in order to obtain specimens of feces to test for benzpyrene. For this test a single pellet of the feces was put into a small test tube to which 1 to 3 ml of benzene was added. The tube was shaken briefly and then observed for blue fluorescence with an ultraviolet light (Aloe No. 52140, ultraviolet mineralight, high intensity, long wave 3660Å). A blue fluorescence was interpreted as suggestive of the presence of benzpyrene. Absorption curves for benzpyrene were made on a Beckman spectrophotometer on some of these stool specimens. Some of the pellets of feces were observed for benzpyrene crystals under a dissecting microscope with ultraviolet light.

The roaches were anesthetized with ether, put into small jars, and covered with benzene. The bodies were then macerated to determine whether or not benzpyrene was present. Sometimes only the legs of roaches were

removed for extraction. After remaining in the benzene for intervals of 1 to 24 h, the supernatant fluid was removed and observed with ultraviolet light. An absorption curve for benzpyrene was obtained on many of these specimens, using the Beckman spectrophotometer.

Two additional hydrocarbons, pyrene and anthracene, were added to the food in a concentration of 5 mg/g of laboratory chow. This was fed to 2 groups of roaches. On the 6th day the food containing these hydrocarbons was discontinued and the roaches were fed the standard ration. Some of the roaches were killed. Pyrene and anthracene were extracted from the tissues in benzene using the same technique as previously described for extracting benzpyrene from the body of the roach.

In some of the experiments the cockroaches were anesthetized, put into the freezing compartments of a refrigerator, and kept for varying intervals before they were either photographed or put into benzene for extraction. Roaches were observed and photographed using the ultraviolet light. Eastman's Ektachrome daylight type film with a 2A gelatin filter was used for all colored transparencies. Black and white photographs also were made using ultraviolet light.

**Results.** Roaches readily eat laboratory chow containing benzpyrene. There has been no evidence that benzpyrene is injurious to the roach when fed for a period of 2 months. Stools were positive for benzpyrene within 8 h following the feeding of benzpyrene-containing food. Control specimens always were negative for benzpyrene. Numerous yellow crystals, consistent with benzpyrene, were present in stools of treated roaches. The stools remained positive for benzpyrene for approximately 72 h when they were obtained from insects fed benzpyrene-containing food and then changed to normal laboratory chow (Figure 1).

Benzpyrene is extracted readily from the body of roaches fed benzpyrene-containing food (Figure 2). Benz-

<sup>1</sup> Supported by grant CA 01469-11 from the National Cancer Institute, Public Health Service.

<sup>2</sup> R. H. RIGDON and J. NEAL, Texas Rept. Biol. Med. June (1963).

<sup>3</sup> R. T. WILLIAMS, *Detoxication Mechanism*, 2nd ed. (John Wiley and Sons, Inc., New York 1959), p. 222, 224.

<sup>4</sup> J. G. CHAMBERS and A. H. M. KIRBY, *Biochem. J.* **34**, 1191 (1940).

<sup>5</sup> P. KOTIN, H. L. FALK, and R. BUSSE, *J. Natl. Cancer Inst.* **23**, 541 (1959).