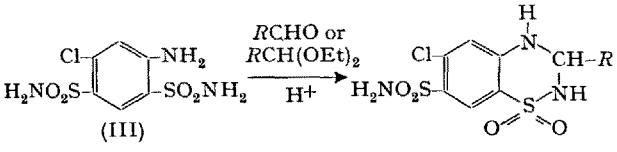
represented by formula II. While this work was in progress, DE STEVENS *et al.* described the synthesis and diuretic activity of 6-chloro-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide, II (R = H)[2]. From our own findings and those reported by DE STEVENS *et al.*, it was apparent that hydrogenation of the 3,4 double bond in I resulted in a compound with at least a ten fold increase in potency together with a somewhat improved electrolyte excretion pattern. With variation in R this relationship seemed to hold for most cases.

Compounds of type II were prepared by condensation of 5-chloro-2,4-disulfamylaniline (III) with the appropriate aldehyde or its acetal in a suitable solvent, usually in the presence of an acid catalyst.



Of the many types of 3-substituents in the 3-substituted 3,4-dihydrobenzothiadiazine dioxides thus synthesized the 3-haloalkyl series was among the more noteworthy. In the halomethyl series the dihalomethyl compounds were found to be far more active than their mono or trihalomethyl counterparts as determined by oral studies in animals. Thus the activities of the monochloromethyl, dichloromethyl, and trichloromethyl compounds were found to be approximately two, fifteen, and one-half, respectively, relative to hydrochlorothiazide taken as one.

3-Dichloromethyl-6-chloro-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide, II, $R = CHCl_2$, has been extensively tested orally in rats and dogs for its effect on electrolyte excretion and urine flow rates. These studies showed that the compound was ten to twenty times as potent as hydrochlorothiazide, one hundred to two hundred times as potent as chlorothiazide and exhibited a low order of toxicity. The greatly increased sodium and chloride ion excretion rates showed virtual correspondence with the enhanced urine flow rate. The output of potassium and bicarbonate ions was not materially affected and in this connection it is interesting that the compound was found to be a very weak carbonic anhydrase inhibitor. Clinical trials[3] have confirmed the potency ratio determined in animal experiments and have also demonstrated a significant reduction in the excretion of potassium ion relative to sodium ion compared with chlorothiazide and hydrochlorothiazide.

MARGARET H. SHERLOCK,
N. SPERBER, and J. TOPLISS

Medicinal Chemical Research Department, Schering Corporation, Bloomfield (New Jersey), January 12, 1960.

Zusammenfassung

Die Synthese und diuretische Aktivität von 3-Haloalkyl-dihydrobenzothiadiazin-dioxyden, insbesondere 3-Dichloromethyl-6-chlor-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxyd, II, $R = CHCl_2$, werden beschrieben.

Some Histochemical Observations on the Cuticle of Fasciola indica Verma, 1953

Presence of -S-S- bonding and polyphenol which may act as precursor of tanning, have been reported in the external cortical layer of certain nematodes like *Ascaris* and *Proleptus obtuses*[1–3]; but little attention seems to have been paid to the study of cuticle of trematodes. In the present investigation the authors have made histochemical observations on the cuticle of the trematode *Fasciola indica* Verma, 1953, recovered from the liver of freshly killed buffalo. Live specimens of the trematode brought to the laboratory in a thermos-flask containing physiological saline at 37°C were used for this purpose. Frozen and paraffin sections, as well as thin strips cut along the margin of the flattened worms (containing only the integument), were studied. Methods described by COWDRY[4], PEARSE[5], TRIM[6], and SMYTH[7,8] were employed for testing presence of proteins, fats, phenols, aromatic crosslinkage, and -S-S- bonds.

The results of the various histochemical tests on the cuticle of *Fasciola indica* have been summarized in the following Table.

Groups	Tests	Results
Proteins	Biuret	Positive
	Xanthoproteic	Positive
Glycol group	P.A.S.	Positive (pink)
	P.A.S. after chloroform extraction	Positive
	P.A.S. after saliva treatment	Positive
	P.A.S. after acetylation	Negative
	P.A.S. after 0·1 *N* KOH treatment of acetylized sections	Positive
	γ-metachromasia with Toluidine blue	Negative
	Methylene blue binding below pH 4	Negative
Phenols, aromatic linkage	Ferric chloride	Negative
	0·2% Catechol	Negative
	Malachite green (G. T. GURR)	Negative
-S-S- bonds	Thioglyocollate	Negative
	Alkaline lead acetate	Negative
Fats	Sudan IV	Negative

The positive Biuret and Xanthoproteic tests obtained in this work are sufficient evidences of the proteinaceous nature of the cuticle. The cuticle also gave a positive P. A. S. reaction. However, the nature of the exact substance causing this reaction could be ascertained only after chloroform extraction, saliva treatment, acetylation, and lastly after alkali treatment of acetylized material, and this in logical sequence demonstrated the presence of

[1] C. H. BROWN, Nature *165*, 275 (1950).
[2] C. H. BROWN, Personal communication to von Brand (1952).
[3] A. F. BIRD, *Exp. Parasitol. 6*, 383 (1957).
[4] E. V. COWDRY, *Laboratory technique in Biology and Medicine*, 2nd Ed. (The William & Wilkins Co., Baltimore 1948).
[5] A. G. E. PEARSE, *Histochemistry Theoretical & Applied* (J. & A. Churchill Ltd., London 1953).
[6] A. R. TRIM, Biochem. J. *35*, 1088 (1941).
[7] J. D. SMYTH, Stain techn. *26*, 255 (1951).
[8] J. D. SMYTH, Quart. J. micr. Sci. *95*, 139 (1954).

1:2 glycol group in the protein. These results are in agreement with similar observations made by GERSH[9] and MCMANUS[10] in some other cases. The absence of a γ-metachromasia reaction with Toluidine blue, supported by a negative Methylene blue binding below pH 4, would suggest the presence of muco or glycoprotein containing 1:2 glycol group. As stated by PEARSE[5], the glycoproteins having hexosamine content of less than 4% stain weakly by P.A.S. (usually paler red or pink) while the mucoproteins stain deep purplish-red. Since the colour obtained by P.A.S. reaction was pink, the cuticle of *Fasciola indica* possibly does contain glycoproteins.

The results of the other histochemical tests given in the Table show absence of phenols, -S-S- bonds and unsaturated lipids.

M. B. LAL and S. C. SHRIVASTAVA

Department of Zoology, The University, Lucknow (India), September 15, 1959.

Résumé

Les essais histochimiques pour la présence des protéïnes, graisses, phénols et réticulation aromatique (aromatic cross linkage) et des liaisons -S-S ont été faits sur le cuticule de *Fasciola indica* Verma, 1953, trematode se trouvant dans le foie du buffle indien. Des résultats positifs pour les protéïnes (le groupe glycol) et négatifs pour les graisses, phénols et réticulation aromatique et les liaisons -S-S ont été obtenus.

[9] I. GERSH, Arch. Path. *47*, 99 (1949).
[10] J. F. A. MCMANUS and J. E. CASON, J. exp. Med. *91*, 651 (1950).

Quantitative Unterschiede der Serummukoproteine bei verschiedenen Spezies

Unter Serummukoproteinen (SMP) versteht man eine Fraktion der Glykoproteine, die saure Mukopolysaccharide in polarer oder anderer leicht trennbarer Bindung an Proteine enthält. Saure Mukopolysaccharide sind Substanzen, die sich aus Hexosaminen, Uronsäuren und Schwefelsäureestern zusammensetzen[1]. Die SMP sind chemisch unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie mit Perchlorsäure nicht fällbar sind, durch Phosphor-Wolframsäure jedoch präzipitiert werden. Man findet in der Literatur[2] allerdings auch die Annahme, dass diese chemischen Eigenschaften vor allem den sogenannten Serummukoiden zustünden, Glykoproteinen, welche Hexosamine in relativ grosser Menge von mehr als 4% in fester Bindung an Proteine enthalten. Die genaue Konstitution dieser Körper sowie ihre Herkunft ist noch nicht geklärt.

Eine ausgeprägte Erhöhung der SMP wird bei Gewebszerfall, vor allem im Verlauf von Entzündungen sowie bei malignen Tumoren gefunden, weshalb die quantitative Bestimmung der SMP in die klinische Laboratoriumsdiagnostik eingeführt wurde. Die Serumwerte sind bei gesunden Individuen sehr konstant.

Im Verlauf unserer Untersuchungen konnten wir bemerkenswerte quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies finden, die wir nachstehend wiedergeben. Möglicherweise lassen sich daraus Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieser Substanzen ableiten.

Methodik und Ergebnisse. 3–5 ml Blut werden sofort nach Entnahme abzentrifugiert und 0,5 ml Serum mit 4,5 ml einer 0,85% NaCl-Lösung versetzt. Nach Hinzufügen von 2,5 ml einer 1,8 *n* Perchlorsäure und Mischen durch zweimaliges Wenden werden die Proben 15 min stehengelassen. Nach Präzipitation wird durch ein Filterpapier (SS-Blaubandfilter) filtriert und 5 ml des Filtrats mit 1 ml einer 5% Phosphor-Wolframsäure versetzt. Die durch die neuerliche Präzipitation aufgetretene Trübung wird nach 30 min quantitativ im Rouy-Photrometer von Leitz bei Filter A und Wasser als Vergleichswert abgelesen. Bei dieser Methode gibt eine wässerige Lösung, die 200 μg Rinderalbumin-N in 5 ml enthält, die gleiche Trübung wie Serum, welches 252 mg% Mukoproteine enthält[3].

n	Ratten SMP in mg%	Menschen SMP in mg%	Kaninchen SMP in mg%	Hühner SMP in mg%
1	61	56	27	22
2	61	51	32	27
3	51	41	27	22
4	61	41	32	22
5	51	46	41	34
6	61	46	34	36
7	71	61	36	
8	61	56	32	
9	66	66	41	
10	66	61		
11	56	66		
12	56	66		
13	66			
14	56			
—	60,2	54,8	33,5	27,1

Die angeführten Spezies unterscheiden sich untereinander hoch signifikant ($p < 0{,}01$) mit Ausnahme der Kaninchen und Hühner, zwischen denen ein Unterschied nur wahrscheinlich ist ($p > 0{,}1$).

Diskussion. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Kaninchen und Hühner im Vergleich zu Ratten und Menschen sehr niedrige Normalwerte aufweisen. Diese Korrelation ist insofern bemerkenswert, als bekanntlich Kaninchen und Hühner sehr wenig Gewebsmastzellen, hingegen reichlich Blutbasophile aufweisen. Diese beiden Tierarten sind auch die einzigen, bei denen sich durch Fettmast eine ausgeprägte Arteriosklerose erzielen lässt. Ratten weisen zahlreiche Gewebsmastzellen, jedoch kaum Blutbasophile auf. Eine Korrelation zwischen Mastzellzahl und Arteriosklerose wurde postuliert[4]. Da die Gewebsmastzellen unter anderem die Hauptträger von Heparin bzw. heparinoiden Substanzen sein dürften, wäre es denkbar, dass ein Mangel an diesen Substanzen sich einerseits in einem niedrigen Mukoproteinspiegel anzeigt, andererseits aber auch durch ein vermindertes Fettklärungsvermögen zur Arteriosklerose bei Belastung führt.

H. BRAUNSTEINER, P. NIEDERBERGER und S. SAILER

II. Medizinische Universitätsklinik in Wien, 29. Februar 1960.

[1] R. J. WINZLER, *Glykoproteins of Plasma*, CIBA-Foundation, Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharids (London 1958), p. 246.
[2] R. WINZLER, *Glykoproteins of Plasma*, CIBA-Foundation, Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharids (London 1958), p. 251.
[3] J. DE LA HUERGA, A. DUBIN, D. S. KUSHNER, H. A. DYNIEWICZ und H. POPPER, J. Lab. clin. Med. *47*, 403 (1956).
[4] P. CONSTANTINIDES, Science *117*, 505 (1953).