
ACTA
TERTII
EUROPAEI
DE CORDIS
SCIENTIA
CONVENTUS

ROMAE
MDCCCCLX

PARS ALTERA
A

ACTA
TERTII EUROPAEI
DE CORDIS SCIENTIA
CONVENTUS

ROMAE A.D. MDCCCCLX

PARS ALTERA

A

AUDITIONES

EXCERPTA MEDICA

COMUNICAZIONI

COMMUNICATIONS

KURZBERICHTE

INDICE

Arteriosclerosi	1
Fisiopatologia coronarica	39
Cardiochirurgia - Circolazione extracorporea	173
Cardiopatie acquisite	249
Cardiopatie congenite	355
Fisiopatologia cardio-polmonare	435
Radioisotopi e curve di coloranti	535

ARTERIOSCLEROSI

ARTERIOSCLEROSE

ARTERIOSCLEROSIS

ARTERIOSKLEROSE

D.J. DE LA HOZ FABRA and D.D. DURAN GUTIERREZ	
Lipids and phospholipids in arteriosclerosis	3
S. GERÖ	
The mechanism of inhibition of cholesterol atherosclerosis by immunisation with beta-lipoprotein	7
H. HOLZNER, E. KRIEHLUBER und R. WENGER	
Über die unterschiedliche Bedeutung tierischer und pflanzlicher Nahrungsfette bei der tierexperimentellen Arterioskleroseentstehung	11
J.B. JAVAKHISHVILY	
Methods of clinical study of atherosclerosis	15
H. MALMROS and G. WIGAND	
Linoleic acid deficiency as the cause of atherosclerosis	17
A. MOGA, I. BACIU, P. PITEA, M. CUCUIANU et A. SUCIU	
Le système fibrinolytique sanguin dans l'athéromatose de l'homme	21
J. ROCHET, J.R. RAHIER et M. VASTESAEGER	
L'utilité de la conjugaison de diverses techniques pour le dépistage précoce de l'athérosclérose	25
P. ROSSI, M. MOTOLESE e F. GIACOMELLI	
Influenza della tiroxina e del benzoato di estradiolo sull'arteriosclerosi polmonare prodotta nel coniglio da somministrazione prolungata de serotonina	27
I. SZIGETI, J. ORMOS, J. JAKO and A. TOSZEGI	
The autoimmunization pathomechanism in experimental atherosclerosis	31
Zdz. WIKTOR, K. JACYSZYN, H. PALUSZYNSKA, R. SZYMANSKI and J. RADZIKOWSKA	
Comparative studies on the plasma lipids levels in groups of different professions in Poland	35

LIPIDS AND PHOSPHOLIPIDS IN ARTERIOSCLEROSIS

by

D. J. DE LA HOZ FABRA and D. D. DURAN GUTIERREZ

Madrid, Spain

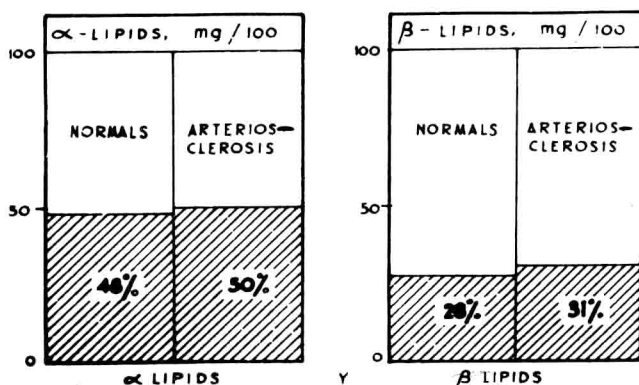
Arteriosclerosis is a process in which the long silent period of its development makes it difficult to determine the exact moment the illness began or even to qualify its development. If we make a general study of this disease we can understand why, in its experimental aspects, the attempts have been many, and yet the positive results which supply any practical information are so few. Therefore, we must agree with Hirst, that it is impossible to reproduce a chronic illness in an animal. Furthermore when we analyse the various pathogenic theories we came to the conclusion that the investigation should be directed to finding the presence of subclinical alterations in lipid metabolism. The arteriosclerotic disease develops through a progressive accumulation of lipid deposits in the intima of arteries. These deposits show a tendency to unite, and are soon surrounded by a zone of reactional sclerosis which disturbs the local histic circulation and results in cellular necroses. Finally, calcareous infiltration of fibrous tissues provides a remarkable resistance to the blood flow; it fatigues the heart and provokes terminal anoxia in the arms, legs and the heart itself. This evolution, on the other hand, is also very frequently complicated by thrombosis. At present, we know that we must search for the origin of the lipidic deposits in the humoral disturbances which affect the lipido-proteinic equilibrium of the blood serum. Macheboeuf has demonstrated that almost the totality of circulating serum lipids was combined with proteins in the form of complexes of ill-defined structure, and whose molecular weight determined the size of these lipoproteins. To date, we have only been able to find an increase of lipids joined to alpha- and beta-globulins. This finding, already observed by many other authors, has had very little clinical significance. We believe that a study of analytical separation must be continued and that an attempt must be made to obtain facts and correlations which have greater diagnostic and prognostic importance in diseases and syndromes which, from previous electrophoretic studies, we know are outside normal values. To this end, we have directed our investigations to a group of arteriosclerotic patients simultaneously with studies on diabetics.

All tests were made on carefully separated sera free from haemolysis. Extractions were made from the sera of patients who had fasted and tests were begun immediately after the serum had been separated. Sixteen male patients were selected; all clinically diagnosed as having more or less advanced arteriosclerotic processes. In a study planned for the future, we shall make similar investigations on women and verify any possible differences found with the data obtained in males. Other chemical determinations: cholesterol phospholipids, triglycerides, fatty acids and total lipids have been determined and tested (Bloor, Fiske, Subbarow, Factor 25 for conversion into phospholipids, etc.).

The electrophoretic separation was as follows: ten strips of Watman paper no. 1 were used for the same serum (3 trays containing 2 strips each and 1 with 4).

Conditions were the same for all: Michaelis' buffer, 60 volts and 15 hour's migration.

To localize the protein fraction use was made of black amido for staining; the strips were rinsed with methyl alcohol (10% in 50% ethanol). The lipids were stained with Sudan black; it is necessary to filter this solution



AVERAGE VALUES FOR LIPIDS AND PHOSPHOLIPIDS IN NORMAL AND ARTERIOSCLEROTIC PATIENTS

ELECTROPHORESIS:	NORMAL	ARTERIOSCLEROSIS
<u>Lipoproteins</u>		
Zone α	29/100 ml	19 19/100 ml
Zone β	71/100 ml	81 /100 ml
<u>Phospholipids</u>		
Zone α	33/100 ml	24/100 ml
Zone β	67/100 ml	76/100 ml

CHEMICAL DETERMINATIONS IN:	NORMAL	ARTERIOSCLEROSIS
Total Cholesterol	169 mg/100 ml	209 mg/100 ml
Phospholipids	8.1 mg/100 ml	10 mg/100 ml
Phospholipids (Factor 25)	202.5 mg/100 ml	250 mg/100 ml
Triglycerides	82 0 mg/100 ml	160.3 mg/100 ml
Total Lipids	560.8 mg/100 ml	690.4 mg/100 ml

several times before using. The strips were stained for 12 to 15 hours and washed 3 or 4 times thereafter with 40% alcohol. Before staining, half the strips were treated with a hot saturated solution of $MgCl_2$ in acetone; and we obtained separation of the phospholipids which are insoluble in it. The curves (charts) were obtained through densimetry and numerical evaluations planimetrically.

RESULTS

An increase in the beta-lipids and, on the average, a slight decrease in alpha-lipids were found in the sera of arteriosclerotic patients. The ratio, beta-lipids/alpha-lipids found to be 2.7 in normals, was increased to 4.2 in these patients. The same applies to phospholipids though the increase was not so remarkable. On evaluating the lipid and phospholipid contents in every separate fraction we found the in the beta zone the total lipids/phospholipids index was increased while in the alpha zone the same index showed a decrease.

RESUME

Suite aux résultats obtenus les auteurs arrivent aux conclusions suivantes, qu'ils considèrent typiques des processus artériosclérotiques:

1. Les bêta-lipides sont augmentés.
2. Les bêta-phospholipides sont augmentés.
3. Le pourcentage des phospholipides contenus dans les lipides totaux de la zone bêta est diminué; c'est à dire que le rapport entre les lipides totaux et les phospholipides dans cette zone est augmentée.
4. Les alpha-lipides sont diminués.
5. Le pourcentage des phospholipides contenus dans les lipides totaux de la zone alpha est augmenté, c'est à dire que le rapport entre les lipides totaux et les phospholipides de la zone alpha est diminué.

Les auteurs estiment, que les variations de ces deux index:

Lipides de la zone bêta,

Phospholipides de la zone bêta

Lipides de la zone alpha

Phospholipides de la zone alpha

et Lipides de la zone bêta,

Lipides de la zone alpha

Phospholipides de la zone bêta

Phospholipides de la zone alpha

sont constants dans les procès artériosclérotiques et différents de ceux obtenus chez des sujets normaux, et qu'ils représentent une donnée importante pour juger le degré d'évolution d'un processus artériosclérotique.

THE MECHANISM OF INHIBITION OF CHOLESTEROL ATHEROSCLEROSIS BY IMMUNISATION WITH BETA-LIPOPROTEIN

by

S. GERÖ

Budapest, Hungary

Last year we reported the first results of our experiments in which we found that the development of cholesterol atherosclerosis in rabbits and cocks can be definitely inhibited by previous immunization with beta-lipoproteins. These results have now been confirmed by us on larger numbers of animals (16 rabbits and 17 cocks). The aortas of the immunized animals showed either no changes at all or relatively few plaques, whereas several hundred per cent rise in plasma cholesterol level developed in the immunized as well as in the control groups. The specificity of beta-lipoprotein immunization appears to be evident, as immunization with other antigens of different kind (human gamma-globulin, tetanus anatoxin, homologous vessel wall antigen) did not produce any inhibitory effect. In this paper we are going to present some data concerning the mechanism of the inhibitory effect. Two possibilities may be propounded:

(a) The circulating antibodies against beta-lipoprotein may interfere with the 'atherogenic' macromolecular beta-lipoproteins increased during cholesterol-feeding and form a complex compound unadapted for deposition in the intima. Several types of experimental hyperlipaemias are known (cholesterol-feeding in alloxan diabetic animals, hyperlipaemia and hyper-cholesterolaemia after administration of detergents and of Seifter's lipid mobilizing factor), without traceable intimal lipid deposition. These observations may be explained by minute alterations of lipid transport.

(b) It is well known, that antigen-antibody reaction may occur in the connective tissue ground substance, which is considered to be the morphological substrate of hyperergic reactions. Besides, proteins mucopolysaccharides (MPS) are the characteristic constituents of the ground substance.

According to literature, after immunization with different antigens (plasma proteins, different viral and bacterial vaccines) alterations in the concentration and composition of the MPS-s of the plasma can be observed.

I.

In our experiments we followed the alterations of the MPS-s of the serum during immunization with beta-lipoproteins. Seromucoid levels were found significantly elevated in both species. Changes of protein-bound hexose concentration were different in the two species: i. e. the values were elevated in rabbits, remained unaltered in cocks. Hexosamine levels did not change in either groups the concentration of sialic acid remained unchanged in cocks and decreased in rabbits.

According to Lindner and Diesel the local accumulation of hexosamine and neuraminic acid in the vessel wall is a characteristic early sign of atherosclerotic plaques. Further investigations are necessary to clarify the relation between the behaviour of plasma hexosamine and sialic acid (a derivative of neuraminic acid) concentration during our immunization procedure and the absence of atheromatous plaques after cholesterol-feeding.

Alterations of the MPS structure in the ground substance of the vessels during the development of atherosclerosis has been demonstrated by histochemical, biochemical and isotope (S^{35} uptake) methods. These changes are reflected by the alterations of MPS-s of the plasma. Our findings concerning the alterations of the plasma MPS values during cholesterol-feeding in previously immunized and control animals indicate in the control groups of both species definite increase of protein-bound hexose-, hexosamine-, and sialic acid concentrations. Different data have been obtained in the groups previously immunized with beta-lipoproteins. The concentration of protein-bound hexose and of hexosamine increased significantly after cholesterol-feeding in the sera of the immunized rabbits, whereas the concentration of sialic acid remained unaltered. No significant change of hexosamine level or sialic acid level has been revealed in the sera of immunized and cholesterol-fed cocks.

Antonini and Mininni observed in rabbits the increase of protein-bound hexose, Schwartz, et al., found the increase of hexosamine concentration in cholesterol atherosclerosis. Our experiments indicate the particular importance of sialic acid as to the effect of beta-lipoprotein immunization. This is emphasized partly by the behaviour of sialic acid during immunization, and partly by the fact, that during cholesterol feeding the level of this MPS fraction in the blood of the immunized animals remains unaltered. In pathological conditions the concentration of sialic acid may change independently of the other MPS-s, even in the opposite direction. In muscular dystrophy Oppenheimer observed, in addition to a decrease of protein-bound hexose, augmentation in the concentration of sialic acid. One of my coworkers detected the isolated decrease of sialic acid concentration of the sera in patients with familial haemolytic icterus.

III

In agreement with several authors our histological findings also indicate that in early intimal lesions alterations of the ground substance prevail: lipid deposition in the intima is preceded by oedema and metachromatic mucoid accumulations. Several authors assume specific lipid affinity of these mucoid substances (especially of chondroitin sulphate) based on the observation, that lipid accumulation is particularly demonstrable in areas rich in metachromatic substances. In the following we will discuss the role of mucoid material of the intima in lipid deposition. Bernfeld and associates demonstrated the specific complex formation between some macromolecular poly-anions and beta-lipoprotein. Based on this we have assumed the existence of a kind of complex-formation between the substances of similar chemical character, accumulated in the aortic wall (mucoids) and the plasma beta-lipoprotein. Thus, the formation of this specific complex might be considered as the beginning of the process of lipid deposition.

1. Using the method of Dyrbye and Kirk, the MPS-s of the sclerotic intima of human aorta were isolated. The isolated MPS could be separated electrophoretically into two fractions: one of them having a higher mobility (exhibiting the characteristics of chondroitin sulphate), and the other with a lower mobility, PAS positive, with mere traces of sulphate.
2. The mixture of MPS-s obtained from the aorta was electrophorized after being mixed with human beta-lipoprotein of high purity. We could establish, that beta-lipoproteins moved together with the MPS fraction of lower mobility.
3. After having mixed the aortic MPS-s with total human serum we submitted them to electrophoresis and found that the beta-lipoprotein fraction also moved with the MPS component of lower mobility. In fact, the mobility of plasma alpha-lipoproteins did not show any change, indicating that these are not bound by the MPS-s of the vessel wall.

These investigations support our theory that the basis of deposition of plasma lipids is a specific ability of certain MPS-s of the aortic intima to bind beta-

lipoprotein. Our experiments are contradictory to the assumption that this phenomenon must be attributed to the accumulation of chondroitin sulphate in the vessel wall. Based on these observations we are of the opinion that after immunization with beta-lipoprotein the MPS structure of the vascular ground substance will be altered. Consequently, the prerequisites for deposition of beta-lipoproteins will be absent. This may render the key for the inhibition of atherosclerosis by immunization with beta-lipoprotein.

My associates in this study were: J. Gergely, M.D., L. Jakab, M.D., T. Dévényi, Ph. D., J. Székely, M.D., S. Virág, M.D.

RESUME

1. Le développement de l'athérosclérose cholestérolique chez des lapins et des coqs peut être empêché par l'immunisation aux bêta-lipoprotéines; en même temps nous observons une augmentation identique du taux du cholestérol plasmatique dans les deux groupes d'animaux, immunisés et témoins, nourris en cholestérol.

2. Les modifications du taux des différentes fractions mucopolysaccharidiques du plasma (seromucoïde, hexoses conjugués aux protéines, hexosamine et acide sialique) observées chez nos animaux immunisés aux bêta-lipoprotéines, ont permis de constater des variations dissociées des diverses fractions. Le fait que le taux de l'acide sialique est diminué ou reste inchangé chez les animaux immunisés, nous semble avoir une importance considérable. Après le traitement au cholestérol des deux groupes d'animaux (immunisés et témoins) les mucopolysaccharides sériques montrent un changement différent. Pendant que chez les animaux non immunisés, la concentration de toutes les fractions mucopolysaccharidiques augmente, la concentration de l'acide sialique reste inchangée chez les deux espèces immunisées. Chez le coq non seulement le taux de l'acide sialique reste inchangé, mais aussi celui de l'hexosamine.

3. Nous avons établi, que des deux fractions mucopolysaccharidiques isolées dans l'intima aortique, seule celle qui présente une mobilité électrophorétique basse est capable de former des complexes avec la bêta-lipoprotéine. On peut supposer que le dépôt des lipides dans la paroi vasculaire se base sur la formation d'un complexe entre les mucopolysaccharides de la paroi et les bêta-lipoprotéides du plasma sanguin. Il est possible, qu'au cours de l'immunisation avec les bêta-lipoprotéines, la structure des mucopolysaccharides du tissu conjonctif des parois vasculaires subit de tels changements, que ce tissu conjonctif ne se prêtera plus guère du dépôt des bêta-lipoprotéines.

ÜBER DIE UNTERSCHIEDLICHE BEDEUTUNG TIERISCHER UND PFLANZLICHER NAHRUNGSFETTE BEI DER TIEREXPERIMENTELLEN ARTERIOSKLEROSEENTSTEHUNG

von

H. HOLZNER, E. KRIEHLER UND R. WENGER

Wien, Österreich

Seit langem schon wird über die Frage diskutiert, ob in der Diätetik bzw. zur Prophylaxe der Arteriosklerose pflanzliches Fett tierischem vorzuziehen sei.

Es ist lange Zeit bekannt, dass nach Umstellung von tierischem auf pflanzliches Fett der Cholesterinspiegel im Blut absinkt, aber nach neuerlicher tierischer Fettzufuhr ansteigt. In gleicher Weise verhalten sich dabei die Lipoproteide. Auch vergleichende Untersuchungen an Menschengruppen, die mit rein vegetarischer und gemischter Kost durchgeführt worden sind, ergaben ähnliche Befunde. So konnte festgestellt werden, dass bei den sich rein vegetarisch ernährenden jemenitischen Juden in Israel die Mortalität an Arteriosklerose viel geringer war als bei den europäischen Einwanderern.

Von dem chemischen Unterschieden zwischen tierischem und pflanzlichem Fett sei erwähnt, dass die tierischen Fette Cholesterin enthalten; in manchen Fetten bzw. Ölen verschiedener Meerestiere, z.B. vom Seehund, sind die Cholesterinmengen nur gering. Halden hat darauf hingewiesen, dass die pflanzlichen Fette die Cholesterinvorstufe Squalen enthalten. Das dem pflanzlichen Fett entsprechende Sterin ist das Phytosterin, allerdings sind die pflanzlichen Sterine schwerer resorbierbar als die tierischen. Es bestehen auch hinsichtlich des Fettsäuregehaltes gewisse Unterschiede. Tierische Fette enthalten im allgemeinen mehr gesättigte Fettsäuren als pflanzliche Fette, umgekehrt verhält es sich durchschnittlich mit den ungesättigten Fettsäuren.

Von Interesse sind auch die Untersuchungsergebnisse, dass z.B. Ölsäurezusatz die Entstehung einer tierexperimentellen Arteriosklerose weitgehend zu verhindern vermag. Sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch konnte unter Verabreichung von Pflanzensterinen ein Absinken des Blutcholesterinbildes beobachtet werden.

Zur Klärung der Frage unterschiedlicher Wirkungen von tierischem und pflanzlichem Fett auf die Arterioskleroseentstehung führten wir, gleichsam als Modellversuch, experimentelle Untersuchungen bei Kaninchen durch. Wir beabsichtigten, durch Cholesterinverabreichung eine Fütterungsarteriosklerose zu erzeugen und durch Beifütterung je eines tierischen bzw. pflanzlichen Fettes zu untersuchen, ob die Ausbildung der arteriosklerotischen Veränderungen von der Fettart abhängig ist. Aber auch Olivenöl oder Schweineschmalz allein wurde mittels einer Sonde verfüttert, um den Einfluss dieser Fettarten auf die Arterioskleroseentstehung zu studieren.

Kürzlich bestätigte auch Malmros, dass Kaninchen für derartige Versuche geeigneter sind als z.B. Hühner. Der Einwand, dass Kaninchen als reine Pflanzenfresser nicht an Spontanarteriosklerose erkranken, wird dadurch entkräftet, dass es spontan entstandene arteriosklerotische Veränderungen bei Kaninchen gibt. Hedinger und Löb fanden unter 100 Kaninchen keine Spontanarteriosklerose.

Es wurden junge Kaninchen annähernd gleichen Alters und Gewichts

verwendet. Neben dem Normalfutter wurde in der Serie A folgende Dosierung verabfolgt:

1. Gruppe: 1 g Cholesterin,
2. Gruppe: 10 g Olivenöl + 1 g Cholesterin,
3. Gruppe: 10 g Olivenöl,
4. Gruppe: 10 g Schweineschmalz + 1 g Cholesterin,
5. Gruppe: 10 g Schweineschmalz.

Serie B. Infolge grosser Ausfälle an Tieren, oftmals schon nach wenigen Tagen, wurde diese 2. Versuchsserie mit einer geringeren Dosierung der Fette durchgeführt. Die Tiere erhielten gewöhnlich anfangs während einiger Tage mittels Sondenfütterung die Hälfte der nachstehend angeführten Dosierungen:

Neben Normalfutter erhielt die

1. Gruppe: 1 g Cholesterin,
2. Gruppe: 5 g Olivenöl + 1 g Cholesterin,
3. Gruppe: 5 g Olivenöl,
4. Gruppe: 5 g Schweineschmalz + 1 g Cholesterin,
5. Gruppe: 5 g Schweineschmalz.

Es wurde getrachtet, bei jedem Tier eine Anzahl von mindestens 90 Sondenfütterungen (1 Fütterung pro Tag) zu erreichen. Infolge grosser Ausfälle war es sehr schwierig und nicht bei allen Tieren möglich, die erstrebten 90 Sondenfütterungen zu erreichen. Bei der Serie A waren die Ausfälle an Tieren besonders gross. Nur jene Tiere wurden zur Auswertung herangezogen, bei denen eine grössere Zahl von Sondenfütterungen, mindestens 54, durchgeführt werden konnte.

Es wurden die arteriosklerotischen Veränderungen an der Aorta, den grossen Gefässen des Halses und der Extremitäten, an Gefässen des Mesenteriums, der Niere und der Skelettmuskulatur sowie der Coronargefässe genau makro-, bzw. mikroskopisch unter Verwendung verschiedener Färbemethoden untersucht. Dabei ergab sich folgendes:

1) Bei den mit Schweineschmalz gefütterten Tieren traten wesentlich häufigere und schwerere arteriosklerotische Veränderungen auf als bei solchen, die mit gleichen Mengen Olivenöl gefüttert wurden. Auch bei der Verfütterung von Cholesterin bei Schweineschmalz- bzw. Olivenölgaben waren die arteriosklerotischen Veränderungen in der Gruppe Cholesterin + Schweineschmalz anscheinend etwas stärker ausgeprägt als in der Gruppe Cholesterin + Olivenöl. Es kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse nicht unterschieden werden, ob vielleicht der höhere Gehalt des Schweineschmalzes an gesättigten Fettsäuren oder sein geringerer Gehalt an Olsäure dafür die Ursache ist.

2) Die Fütterungsdauer scheint von Einfluss auf die Arterioskleroseentstehung zu sein.

3) Die Menge des verfütterten Fettes war - ausser bei der Verabreichung von Olivenöl allein, neben dem Normalfutter - für die Ausbildung der arteriosklerotischen Veränderungen von Bedeutung. Unter 22 Fällen, welche nur Olivenöl neben dem Normalfutter erhalten haben, waren nur in 1 Fall leichtere arteriosklerotische Veränderungen festzustellen.

4) Der Vergleich der Gruppen Cholesterin sowie Cholesterin + Olivenöl ergibt einen geringeren Arteriosklerosebefall der 2. Gruppe. Es wird daran gedacht, dass das beigefütterte Olivenöl in einer bestimmten Dosierung unter Umständen eine Schutzwirkung gegenüber dem gleichzeitig verabreichten Cholesterin entfaltet (möglicherweise infolge Behinderung der Cholesterinresorption durch pflanzliche Sterine).

RESUME

Nous rapportons ici des investigations expérimentales faites sur des lapins. Un groupe de lapins avait reçu seulement du cholestérol par sonde, un autre groupe l'avait reçu avec du lard, et un troisième avec de l'huile d'olive. Deux autres groupes avaient reçu respectivement du lard ou de l'huile d'olive seulement. En ce qui concerne l'extension de l'artériosclérose dans ces différents groupes d'animaux, la différence était significative. On discute la possibilité d'une action protectrice de l'huile végétale contre l'artériosclérose due au cholestérol.

SUMMARY

Report concerning experimental investigations on rabbits which were tube-fed with (1) cholesterol, (2) cholesterol with animal fat (lard) and (3) cholesterol with vegetable fat (olive oil). Two other groups were fed with lard or olive oil only. Significant differences in the extent of the arteriosclerosis have been observed. The possible aetiological factors are discussed. A protective action of vegetable fats against the arteriosclerosis-inducing effect of cholesterol is taken into consideration.