

Attivazione neuroendocrina nell'infarto acuto del miocardio: stato dell'arte e risultati preliminari sul peptide vasoattivo intestinale

Stefania CAIOLA (a), Piernatale LUCIA (b), Alessandro COPPOLA (b), Ettore MAROCCIA (a),
Marco BELLI (b), Giuseppe RICCIARDI (a), Lola Giuditta BORELLI (b), Antonella
COLLIARDO (b), Carlo DE MARTINIS (b) e Angela Maria BUONGIORNO (a)

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) II Clinica Medica, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Riassunto. - L'attivazione neuroendocrina indotta dall'infarto acuto del miocardio (IMA) riguarda soprattutto il sistema simpatico-catecolaminico, il sistema renina-angiotensina, il cortisolo, il peptide natriuretico atriale e l'endotelina. I risultati preliminari del nostro studio dimostrano che, nelle prime 24 ore di decorso dell'IMA, anche il peptide vasoattivo intestinale (VIP) partecipa al processo d'attivazione neuroendocrina. I livelli circolanti del VIP nei soggetti colpiti da IMA risultano, infatti, più elevati di quelli dei soggetti sani, nelle prime ore dall'evento. Diminuiscono, decisamente, dopo circa 24 ore, per tornare a valori normali dopo due settimane. Da un punto di vista prognostico, appare importante il significativo incremento della concentrazione del VIP nei pazienti con decorso favorevole della patologia rispetto a quella dei malati deceduti entro le prime due settimane di degenza. Il fenomeno potrebbe essere considerato come una risposta positiva dell'organismo, messa in atto per ripristinare l'omeostasi circolatoria.

Parole chiave: infarto del miocardio (IMA), peptide vasoattivo intestinale (VIP).

Summary (Neuroendocrine activation in acute myocardial infarction: state of art and first results on the vasoactive intestinal peptide). - Acute myocardial infarction (AMI) is known to be associated with a complex neuroendocrine activation, especially concerning sympathetic and renin-angiotensin systems, cortisol, atrial natriuretic peptide and endothelin. Results of our study show that the vasoactive intestinal peptide (VIP), also, is early involved in the neuroendocrine activation occurring in AMI. Plasma concentration of VIP, significantly increased in AMI patients within 6 hours after the onset of chest pain, soon decreased and remained below than normal along the first week. At the 14th day of the AMI, plasma levels of VIP returned into the normal range. A significant increase of VIP plasma concentration is detectable in the first hours of AMI in survived as compared with died patients. The phenomenon seems to be a suitable process to provide an endogenous support to the ischemic heart and to counteract the negative effects of other neuroendocrine activated factors.

Key words: acute myocardial infarction, vasoactive intestinal peptide (VIP).

Introduzione

La regolazione fisiologica dell'apparato cardiovascolare è assai complessa ed è influenzata dall'azione congiunta ed integrata di alcuni componenti endocrini, quali il sistema simpatico-catecolaminico, il sistema renina-angiotensina, il cortisolo, il peptide natriuretico atriale e l'endotelina. Tutti questi elementi concorrono ad assicurare l'equilibrio emodinamico della circolazione sanguigna. Studi recenti hanno portato alla scoperta di nuove molecole endocrine che possono giocare un ruolo nella fisiopatologia cardiaca. Tra queste va annoverato il peptide vasoattivo intestinale (VIP), che manifesta la sua azione non solo sull'apparato gastroenterico, ma anche sul miocardio e sui vasi periferici d'ogni tipo, grandezza e sede.

Approfondire la conoscenza sulla fisiopatologia di tali sistemi endocrini, trova la sua utilità in ognuna delle fasi che compongono l'*iter* clinico della malattia acuta coronarica. Infatti il dosaggio di tali ormoni consente di:

1) *migliorare l'accuratezza diagnostica*, poiché l'entità dell'attivazione endocrina si correla all'estensione del territorio miocardico colpito dall'ischemia; 2) *accrescere la precisione nella formulazione prognostica*, in quanto l'incidenza delle complicanze emodinamiche ed aritmiche, principali determinanti della prognosi "quoad vitam" a breve, medio e lungo termine, appare proporzionale all'entità della risposta endocrina e neurovegetativa; 3) *migliorare la strategia terapeutica* attraverso: a) la correzione dei possibili danni metabolici causati sia da variazioni ormonali sia da alterazione dei substrati nell'area ischemica; b) la prevenzione e la

correzione delle eventuali complicanze cardiovascolari non primitivamente indotte dall'IMA, ma secondarie all'attivazione endocrina scatenata dall'evento acuto.

In questa prospettiva abbiamo intrapreso uno studio sul possibile valore prognostico del VIP nell'IMA.

Peptide vasoattivo intestinale e apparato cardiovascolare

Il peptide vasoattivo intestinale (VIP) è una molecola composta da 28 aminoacidi, strutturalmente correlata a numerosi altri peptidi (secretina, glucagone, CFR, GIP ecc.) [1, 2], considerato, inizialmente, come un peptide d'esclusiva origine e azione gastrointestinale. Numerosi studi hanno definitivamente chiarito che fibre nervose contenenti VIP sono pressoché ubiquitarie nell'organismo e largamente presenti sia nel sistema nervoso centrale sia periferico (Tab. 1) [3-10]. Al VIP può essere assegnato un ruolo di neurotrasmettore e neuromodulatore [5-11] in grado di esplicare la sua attività attraverso l'interazione diretta con recettori specifici [11-14]. Fibre VIPergiche sono presenti anche nel tessuto miocardico [15, 16] e in numero maggiore in

quello atriale rispetto a quello ventricolare. Inoltre, l'innervazione VIPergica è più abbondante intorno al nodo seno-atriale rispetto al quello atrio-ventricolare [4]. Essa, in ogni caso, appare più densa a livello del setto e intorno alle vie di conduzione [17, 18]. Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi volti a documentare l'attività del VIP sull'apparato cardiovascolare. Nell'animale da esperimento, l'infusione di VIP determina una significativa azione vasodilatatrice, con riduzione della pressione arteriosa sistemica e polmonare e un aumento del flusso ematico attraverso la marcata diminuzione delle resistenze periferiche [19-22]. Il VIP esercita sul muscolo cardiaco una significativa azione inotropa [14, 24] e cronotropa positiva [14, 16, 25]. L'infusione del peptide induce, in particolare, un aumento del 100% dell'inotropismo ventricolare, lievemente superiore all'incremento atriale. Nel complesso, l'azione farmacologica del VIP è superiore in un rapporto 1:3 rispetto a quella dell'isoproterinolo. La significativa azione inotropa positiva del VIP determina un aumento dell'output e dell'indice cardiaco, parallelamente alla riduzione della pressione telediastolica e della tensione parietale del ventricolo sinistro [20]. L'aumento della frequenza cardiaca, prodotto dal VIP, non è inibito dal

Tabella 1. - Effetti biologici del peptide vasoattivo intestinale (VIP)

Apparato respiratorio	Broncodilatazione; aumento della ventilazione; stimolo della secrezione bronchiale; vasodilatazione polmonare.
Apparato digerente	
Esofago	Rilasciamento sfintere esofageo inferiore.
Stomaco	Rilasciamento muscolatura liscia del fondo; riduzione della secrezione acida.
Fegato, pancreas	Incremento flusso biliare; stimolazione secrezione acqua e HCO_3 (azione simil-secretina).
Colecisti	Rilasciamento muscolatura liscia; inibizione dell'effetto contrattile della colecistochinina.
Intestino	Inibizione assorbimento; stimolazione della secrezione di acqua e cloro; rilasciamento muscolatura liscia del colon.
Effetti biochimici/metabolici	Stimolazione dell'attività dell'adenilatoclasia, della glicogenolisi, della lipolisi, del riassorbimento osseo; iperglicemia.
Attività endocrine	
Pancreas	Stimolazione della secrezione di insulina, glucagone e somatostatina.
Ipotalamo-ipofisi	Stimolazione del rilascio di prolattina, GH e LH; soppressione del rilascio della somatostatina.
Surrene	Stimolazione della steroidogenesi (azione simil ACTH).
Rene	Stimolazione del rilascio della renina dalle cellule luxtaglomerulari.
Sistema nervoso centrale	Stimolazione dei neuroni della corteccia e del midollo; ipertermia; stimolazione della glicogenolisi e dell'utilizzazione di glucosio.
Sistema immunitario	Inibizione della trasformazione mitogenica indotta dei linfociti; stimolazione della sintesi delle Ig; inibizione rilascio istamina dalle Mast-Cell; inibizione dell'aggregazione piastrinica.

beta blocco [26] né dal blocco simpatico pregangliare o dalla vagotomia [26, 27]. Probabilmente gli effetti cronotropi del peptide non sono mediati dal sistema nervoso autonomo, ma dal legame a specifici recettori. Secondo alcuni autori l'incremento della frequenza è dovuto anche al riflesso barocettoriale determinato dalla diminuzione del precarico e dal miglioramento dell'inotropismo [26]. E', infine, interessante segnalare che, *in vitro*, il VIP inibisce l'aggregazione piastrinica mediata dalla serotonina [28].

Gli studi nell'uomo sono, allo stato dell'arte, in numero certamente inferiore rispetto a quelli condotti negli animali da esperimento. Gli effetti indotti dal peptide sull'apparato cardiovascolare di soggetti normali sono risultati pressoché sovrapponibili a quelli verificati nell'animale d'esperimento [22, 23, 29]. Nella patologia cardiaca, le ricerche sono state, finora, sporadiche e poco numerose. Un incremento delle concentrazioni plasmatiche del VIP è stato rilevato nello scompenso cardiaco [30], anche se il campione era costituito da solo 8 pazienti, con patologie di vario tipo. Il cuore umano dilatato sembra essere maggiormente sensibile alla stimolazione dell'adenilatoclasia da parte del VIP [30].

Al pari di quanto avviene per i recettori beta-adrenergici, nel cane si riscontra un aumento dell'affinità ed una diminuzione della densità (circa - 60%) dei recettori ad alta affinità per il VIP. Ad essa corrisponde una riduzione pressoché parallela della capacità di contrazione massima del ventricolo destro [31]. Questi risultati ci hanno stimolato ad approfondire il ruolo fisiopatologico del peptide in alcuni stati morbosì dell'apparato cardiovascolare di maggiore interesse clinico e più vasto impatto epidemiologico. Abbiamo, perciò, intrapreso uno studio sulle variazioni delle concentrazioni plasmatiche del peptide in corso d'infarto acuto del miocardio (IMA). La ricerca è stata orientata a valutare il ruolo diagnostico e terapeutico che quest'ormone potrebbe avere nella patologia cardiaca.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su 30 soggetti, colpiti per la prima volta da IMA (diagnosticato secondo gli usuali criteri clinici, elettrocardiografici e biochimici) e ricoverati entro 6 ore dall'insorgenza della patologia, nell'Unità di Terapia Intensiva Coronarica (UTIC) della II Clinica Medica dell'Università degli Studi "La Sapienza" di Roma. I pazienti, 22 maschi e 8 femmine d'età compresa tra 41 e 82 anni (mediana = 59 anni), non presentavano segni di scompenso cardiaco, erano in equilibrio metabolico ed esenti da altre patologie importanti. A tutti i pazienti era somministrata la terapia più idonea per ciascun caso (nitroderivati, beta-bloccanti, ACE-inibitori, antiaggreganti); a 19 pazienti è stata, inoltre, praticata una terapia fibrinolitica. Nel corso del periodo di

osservazione, 7 pazienti sono deceduti per complicanze dell'IMA. Tutti i pazienti e i controlli hanno dato il loro consenso informato, in accordo con la dichiarazione di Helsinki.

Ciascun paziente è stato sottoposto al primo prelievo di sangue venoso periferico all'ingresso in UTIC, entro sei ore dall'inizio della sintomatologia; i saggi successivi sono stati eseguiti il 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7° e 14° giorno di decorso dall'evento infartuale. Contemporaneamente è stato eseguito il dosaggio dei livelli ematici di CK, CK-MB, AST, ALT e LDH. Il gruppo di controllo, costituito da 30 soggetti sani, volontari non ricoverati, era comparabile per sesso ed età ai pazienti infartuati (19 maschi, 11 femmine, età mediana 60 anni; min-max 44-82). I valori normali, sovrapponibili a quelli della letteratura [32, 33], sono stati ottenuti mediando i risultati dell'analisi di singoli prelievi effettuati nei soggetti di controllo, presumendo che, a parità di condizioni, si confermi lo stesso valore nei giorni successivi.

I prelievi, per entrambi i gruppi, sono stati effettuati al mattino, a digiuno, tra le 7:30 e le 8:30, con il soggetto in cliostatismo da almeno 8 ore. Il sangue, prelevato da un vaso venoso periferico, è stato posto in provette di vetro contenenti EDTA e aprotinina (500 UI/ml); immediatamente centrifugato a 3000 giri per 15 min in apparecchio refrigerato. Il plasma così ottenuto è stato conservato a - 40 °C fino al momento del dosaggio. L'analisi è stata eseguita utilizzando una metodica radioimmunologica basata sul legame competitivo, tra VIP marcato con ^{125}I e non marcato, per un numero limitato di siti leganti anticorpali; mantenendo costanti le quantità di siti anticorpali e di ^{125}I VIP, la quantità di tracciante legata all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di VIP non marcato presente. I valori del VIP sono stati espressi in pmol/l come media \pm DS. I confronti statisticamente significativi sono stati effettuati mediante l'analisi della varianza seguita da t test per confronti multipli e dal test di Student-Newman-Keuls con correzione di Bonferroni a due code per misure ripetute. Per il significato statistico è stata considerata una probabilità $p < 0,05$.

Risultati

La Fig. 1 illustra l'andamento delle concentrazioni plasmatiche del VIP nel corso del periodo di osservazione nei pazienti colpiti da IMA. All'ingresso in UTIC, i livelli circolanti del peptide sono elevati rispetto a quelli dei soggetti normali ($16,33 \pm 5,98$ vs $12,21 \pm 2,41$ pmol/l), anche se la differenza non assume rilevanza statistica. Peraltro, già a distanza di 24 ore dal manifestarsi del quadro clinico, la concentrazione del VIP diminuisce ($10,99 \pm 3,79$ pmol/l) mantenendosi su valori di poco inferiori a quelli normali di riferimento per tutto il periodo di osservazione, per tornare nell'intervallo di normalità in 14° giornata ($11,92 \pm 3,21$ pmol/l). L'analisi

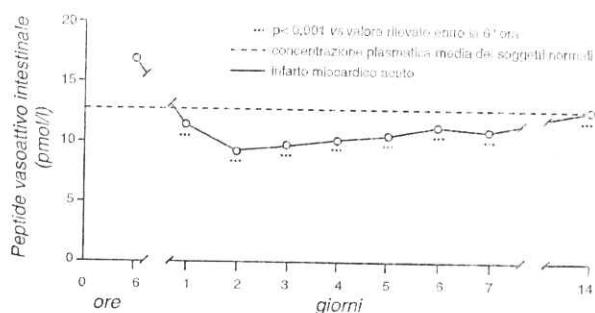


Fig. 1. - Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie del peptide vasoattivo intestinale (VIP) in soggetti normali (----) e nei pazienti IMA (-o-o-) nel corso del periodo di osservazione.

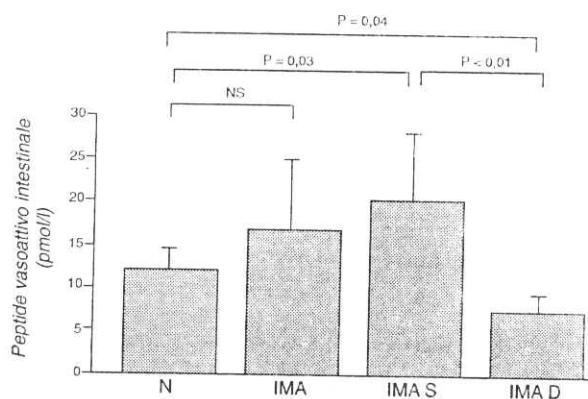


Fig. 2. - Valori del peptide vasoattivo intestinale (VIP) rilevati all'ingresso nell'Unità di Terapia Intensiva Coronarica in tutti i pazienti infartuati (IMA), nei sopravvissuti (IMA S), nei deceduti (IMA D) vs i soggetti normali (N).

della varianza dimostra la presenza di una significativa variabilità nelle concentrazioni plasmatiche del VIP ($p < 0,001$). Il test di Bonferroni rivelava una costante differenza, statisticamente significativa ($p < 0,001$), tra il valore del VIP riscontrato all'ingresso in UTIC e quelli rilevati nei giorni successivi. Il medesimo test non evidenzia invece alcuna sensibile variazione nel confronto tra i diversi valori riscontrati a partire dal 2° giorno in poi.

La Fig. 2 riassume i valori del VIP rilevati nei soggetti normali e quelli riscontrati all'ingresso in UTIC nell'intero gruppo di infartuati e nei pazienti sopravvissuti o deceduti nelle prime due settimane di decorso. Il t test rileva che, pur essendo evidente l'aumento della concentrazione plasmatica del VIP nel gruppo complessivo dei malati, l'incremento non è tale da raggiungere valori che si discostino significativamente da quelli dei soggetti normali. Al contrario, i livelli circolanti di VIP sono apprezzabilmente più alti nei pazienti che sopravvivono ($p = 0,03$) e più bassi in quelli che muoiono ($p = 0,04$) nel corso delle prime due settimane di degenza. Particolare

importanza prognostica assume la marcata differenza tra la concentrazione del VIP di soggetti con decorso favorevole e quella che si riscontra in soggetti deceduti nel corso del periodo d'osservazione ($p < 0,01$).

Discussione

I risultati del nostro studio dimostrano che il VIP partecipa al processo di attivazione neuroendocrina che si verifica soprattutto nelle prime 24 ore dell'IMA. Le concentrazioni plasmatiche del peptide raggiungono, infatti, il picco in prima giornata per poi diminuire rapidamente già dopo 24 ore. Da un punto di vista prognostico, ci sembra opportuno sottolineare, anche se il numero dei pazienti è limitato, che i sopravvissuti nelle prime due settimane di decorso presentano valori plasmatici del VIP statisticamente più elevati, sia rispetto ai pazienti deceduti sia ai valori di riferimento medi. In prima istanza, si può ipotizzare che l'aumento della concentrazione del VIP potrebbe essere dovuta, considerata l'ubiquitarità dell'innervazione VIPergica, sia ad una ridotta perfusione periferica [34], sia ad una riduzione della natriuresi, secondaria ad una pur modesta insufficienza di pompa. Sul fenomeno possono, inoltre, incidere anche le interazioni con altri sistemi endocrini attivati in corso di IMA e potrebbe, infine, influire una ridotta clearance della molecola a livello epatico e renale. Più difficile da spiegare è ciò che accade nei pazienti deceduti nelle prime due settimane della malattia, nei quali il tasso plasmatico del VIP è inferiore sia a quello dei sopravvissuti sia a quello dei soggetti normali. In questo caso si possono invocare o una riduzione della produzione della molecola, o un suo aumentato metabolismo, o un'alterato rilascio dalle terminazioni nervose. Non è possibile, allo stato dell'arte, avanzare un'ipotesi definitiva plausibile e convincente. Tenendo conto, comunque, delle azioni esercitate dal peptide sull'apparato cardiovascolare, l'attivazione delle fibre VIPergiche rappresenta, a nostro avviso, una favorevole risposta dell'organismo, volta ad assicurare un supporto endogeno al miocardio ischemico, sia per ripristinare l'omeostasi circolatoria, sia per contrastare gli effetti negativi prodotti da altri fattori endocrini (catecolamine, renina, cortisolo, endotelina ecc.). Non potendo trarre conclusioni definitive, si può, tuttavia, suggerire, in attesa di ulteriori conferme al dato, che l'increzione deficitaria del VIP nella fase acuta dell'infarto del miocardio può accompagnarsi ad un peggioramento della prognosi "quoad vitam" dei pazienti. A questa prima indagine, faranno seguito altri studi volti a chiarire, ulteriormente, il ruolo del VIP nella patologia miocardica.

BIBLIOGRAFIA

1. MUTT, V. & SAID, S.I. 1974. Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. *Eur. J. Biochem.* **42**: 581-589.
2. SAID, S.D. & MUTT, V. 1972. Isolation from porcine intestinal wall of vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur. J. Biochem.* **28**: 199-204.
3. LUNDBERG, J.M. 1981. Evidence for coexistence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine in neurons of cat exocrine glands morphological, biochemical and functional studies. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **496**: 1-57.
4. WEIHE, E., REINECKE, M. & FORSSMANN, W. 1984. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart. *Cell Tissue Res.* **236**: 527-540.
5. GIACCHETTI, A., SAID, S.I., REYNOLDS, R.C. & KONIGES F.C. 1977. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in brain: localization in, and release from isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3424.
6. MAGISTRETTI, P.J., MORRISON, J.H., SHOEMAKER, W.J., SAPIN, V. & BLOOM, F.E. 1981. Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse control of energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6535.
7. JOHANSSON, O. & LUNDBERG, J.M. 1981. Ultrastructural localization of VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of "cholinergic-type" nerve terminals in cat exocrine glands. *Neuroscience* **6**: 847.
8. LUNDBERG, J.M., ANGGARD, A., FAHRENKRUG, J., HOKFELT, T. & MUTT, V. 1980. Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilatation and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1651-1655.
9. YASUI, A., NARUSE, S., YANAIHARA, C., OZAKI, T., HOSHINO, M., MOSHIZUKI, T., DANIEL, E.E. & YANAIHARA, N. 1987. Corelease of PHI and VIP by vagal stimulation in the dog. *An. J. Physiol.* **253**: G13-G19.
10. FAHRENKRUG, J., GALBO, H., HOLST, J.J. & SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O. 1978. Influence of the autonomic nervous system on the release of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from the porcine gastrointestinal tract. *J. Physiol. Lond.* **280**: 405-422.
11. LEE, T.J.F. & BEREZIN, I. 1984. Vasoactive intestinal polypeptide substance: the potential transmitter for cerebral vasodilatation. *Science* **224**: 898-901.
12. GOYAL, R.K., RATTAN, S. & SAID, S.I. 1980. Vip as a possible neurotransmitter of noncholinergic non-adrenergic inhibitory neurones. *Nature* **288**: 378-380.
13. HAMASAKI, Y., MOJARAD, M. & SAID, S.I. 1983. Relaxant action of VIP on cat pulmonary artery: comparison with acetylcholine, isoproterenol, and PGE1. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exer. Physiol.* **54**(6): 1607-1611.
14. CHRISTOPHE, J., WAELBROECK, M., CHATELAIN, P. & ROBBERECH P. 1984. Heart receptor for VIP, PHI and secretin are able to activate adenylate cyclase and mediate inotropic and chronotropic effects: species variations and physiopathology. *Peptides* **5**: 341-353.
15. FORSSMAN, W.-G., TRIEPEL, J., DAFFNER, C. & HEYM, C. 1988. Vasoactive intestinal peptide in the heart. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **527**: 405-420.
16. RIGEL, D.F. & LATHROP, D.A. 1990. Vasoactive intestinal polypeptide facilitates atrioventricular nodal conduction and shortens atrial and ventricular refractory periods in conscious and anesthetized dogs. *Circ. Res.* **67**: 1323-1333.
17. BRUN, J.M., BOVE, A.A., SUFAN, Q. & REILLY, W. 1986. Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **7**: 406-413.
18. CORR, L. 1992. Neuropeptides and the conduction system of the heart. *Int. J. Cardiol.* **35**: 1-2.
19. SUZUKI, Y., MCMASTER, D., HUANG, M., LEDERIS, K. & RORSTAND, O.P. 1985. Characterization of functional receptor for vasoactive intestinal peptide in bovine cerebral arteries. *J. Neurochem.* **45**: 890-899.
20. UNVERFERTH, D.V., O'DORISIO, T.M., MUIR III, W.W., WHITE, J., MILLER, M.M., HAMLIN, R.L. & MAGORIEN, R.D. 1985. Effect of vasoactive intestinal polypeptide on the canine cardiovascular system. *J. Lab. Clin. Med.* **106**: 542-550.
21. SAID, S.I. & MUTT, V. 1970. Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* **169**: 1217-1218.
22. THULIN, L., NYBERG, B., TYDEN, G. & SONNENFELD, T. 1984. Circulatory effects of VIP in anesthetized man. *Peptides* **5**: 319-323.
23. SMITHERMAN, T.C., POPMA, J.J., SAID, S.I., KREJS, G.J. & DEHMER, G.J. 1989. Coronary hemodynamic effects of intravenous vasoactive intestinal peptide in humans. *Am. J. Physiol.* **257**: H1254-H1262.
24. RIGEL, D.F., GRUPP, I.L., BALASUBRAMANIAM, A. & GRUPP, G. 1989. Contractile effects of cardiac neuropeptides in isolated canine atrial and ventricular muscles. *Am. J. Physiol.* **257**: H1082-H1087.
25. CHANG, F., YU, H. & COHEN, I.S. 1994. Actions of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y on the pacemaker current in canine Purkinje fibers. *Circ. Res.* **74**: 157-162.
26. RIGEL, D.F. 1988. Effects of neuropeptide on heart rate in dogs: comparison of VIP, PHI, NPY, CGRP and NT. *Am. J. Physiol.* **255**: H311-H317.
27. ROCHFORD, J. & HENRY, J.L. 1989. Cardioacceleration provoked by intrathecal administration of vasoactive intestinal peptide (VIP): mediation by a non-central nervous system mechanism. *Neuropeptides* **14**: 243-252.
28. COX, C.P., LINDEN, J. & SAID, S.I. 1984. VIP elevates platelet cycle AMP (cAMP) levels and inhibits *in vitro* platelet-activation factor (PAF). *Peptides* **5**: 324-328.
29. FRASE, L.J., GAFFNEY, A., LYNSDALE, D.L., BUCKEY, J.C., SAID, S.I., BIOMQVIST, G. & KREJS, G.J. 1987. Cardiovascular effects of vasoactive intestinal peptide in healthy subjects. *Am. J. Cardiol.* **60**: 1356-1361.
30. CLARK, A.J.L., ADRIAN, T.E., MCMICHAEL, H.B. & BLOOM, S.R. 1983. Vasoactive intestinal peptide in shock and heart failure. *Lancet* **1**: 539.
31. HERSHBERGER, R.E., ANDERSON, F.L. & BRISTOL, M.R. 1989. Vasoactive intestinal peptide receptor in failing human ventricular myocardium exhibits increased affinity and decreased density. *Circ. Res.* **65**: 283-294.
32. FAHRENKRUG, J. & SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B. 1977. Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma. *J. Lab. Clin. Med.* **89**: 1379-1388.
33. MITCHELL, S.J. & BLOOM, S.R. 1978. Measurement of fasting and postprandial plasma VIP in man. *GUT* **19**: 1043-1048.
34. MODLIN, I.M., BLOOM, S.R. & MITCHELL, S. 1978. Plasma vasoactive intestinal peptide (VIP) levels and intestinal ischaemia. *Experientia* **34**: 535-536.