

*Accepted for poster presentation International Pediatric Nephrology Association
Annual Congress In Seattle 1-5, September 2001*

Diagnostic value of procalcitonin in chronic uraemic patients with systemic infections

Cs. Bereczki P. Megyeri, , F.Papp, É. Sallay, É. Kiss, S. Túri
Dept. of Pediatrics, Acute Nephrology Division, Adult Dialysis Centrum
University of Szeged, HUNGARY

Distinction between infection and systemic inflammation is very difficult in the management of patients with end stage renal failure (ESRF). Both ESRF and bioincompatibility during haemodialysis (HD) have resulted in chronic inflammation. The serum procalcitonin (PCT) is a new marker for systemic bacterial and fungal infection, and it seems to be more sensitive, than other non specific parameters like C-reactive protein (CRP) or erythrocyte sedimentation rate (ESR). The aim of this study was to determine the usefulness of PCT for differentiation between systemic inflammatory syndrome and invasive bacterial infection in ESRF.

Two groups of patients were studied: 90 ESRF patients on HD (aged 17.0 ± 9.3 yrs) and 25 ESRF patients with systemic infection. PTC, white blood cells count (WBC), BUN, creatinine and ionized calcium (iCa) prior and after single haemodialysis session, C-reactive protein (CRP) and intact parathyroid hormone (iPTH) only before HD were measured. PCT were assayed using the LUMItest (Brahms diagnostica).

Slightly elevated serum PCT levels (\pm SEM, 0.75 ± 0.33 ng/ml) were observed in the patients with ESRF compared to reference values. After HD PCT (0.83 ± 0.32 ng/ml) did not differ significantly from those, what measured prior HD. The serum PCT significantly, more than 12-fold elevated in uraemic patients with sepsis (12.56 ± 7.9 ng/ml). The diagnostic specificity in ESRF was 0.74 for PCT and 0.56 for CRP, whereas the sensitivity 0.93 for PCT and 0.97 for CRP. There were no significant correlation between PCT and BUN, PCT and iPTH and PCT and serum creatinine.

In conclusion, the haemodialysis did not influence significantly the slightly elevated PCT serum level in ESRF. In contrast to non-infected ESRF patients those with infection showed significantly elevated PCT serum values. The PCT is a good marker for detecting systemic bacterial infection in end stage renal failure.

Prokalcitonin mRNS vizsgálata szepszises gyermekek torok és mellúri váladékában

(Közlésre elfogadva a Gyermekgyógyászat folyóiratba 2006. febr.-ban!)

Maróti Zoltán, †Megyeri Pál, Endreffy Emőke, Túri Sándor

SZTE, Gyermekgyógyászati Klinika

Összefoglalás

Az intenzív gondozás során a szepszises gyermekek differenciál diagnózisában a prokalcitonin szintek mérése fontos támpontot adhat az infekció diagnosztikájában. Jelenlegi ismereteink szerint a prokalcitonin szerepet játszhat mint mediátor a szepszisben és gyulladásokban megfigyelhető káros hatások kialakulásában. Az aktuális klinikai diagnosztikában a prokalcitonin fehérjét szérumból határozzuk meg. 2002 és 2004 között 1144 beteg szérum PCT vizsgálatát végeztük el, amely fontos támpontnak bizonyult a differenciál diagnosztikában és a betegek további kezelésében. Azonban a PCT eredetének és mediátor szerepének tisztázása napjainknak is aktuális kérdése, amelyet a prokalcitonin mRNS-ének mérésével tisztázhatunk. A klinkán ápolt 8 szepszises (bakteriális és gomba fertőzött) gyermek torok és mellúri váladékát vizsgáltuk molekuláris genetikai (kvantitativ real time PCR) módszerrel. Eredményeink szerint a prokalcitonin mRNS a vizsgálat időpontjában már nem íródott le (expresszáldott) az analizált mintákban, a kontrollként használt háztartási gén (amely a szövetekben konstans szinten fejeződik ki) expresszióját viszont kimutattuk. A jelenség magyarázata: a mononukleáris sejtek PCT termelése tranzitórius jellegű, kitapadásukat követően néhány óráig tart. Azonban az általuk termelt gyulladásos mediátorok kifejezett PCT képződést váltanak ki egyéb szövetekben.

Kulcsszavak: szepszis, prokalcitonin, gén expresszió, real time PCR

Procalcitonin mRNA examination in throat lavage and bronchial secretion of septic children

Zoltán Maróti, †Pál Megyeri, Emőke Endreffy, Sándor Túri

Department of Pediatrics, University of Szeged, Hungary

Summary

At the intensive care units measurement of procalcitonine (PCT) levels in septic children provides an important guideline in the differential diagnostics of infection. To our knowledge PCT may play a role as a mediator in the development of harmful effects during sepsis and infection. In the clinical diagnostic practice PCT is measured at the protein level from serum. Between 2002 and 2004 we examined PCT levels of 1144 patients which gave important guide to the differential diagnostics and further treatment of these patients. However the origin and role of PCT is still an important question which may be examined by mRNA measurement of PCT in different tissues. We examined different samples (throat lavage, throat phlegm, bronchial secretion) of 8 septic patients (bacterial, fungal) with quantitative real time PCR. By our results the mRNA of PCT was not expressed in the analysed samples, although we could detect the expression of a house keeping gene used as control. The explanation is that the PCT expression of mononuclear cells is transitory which only lasts about 3-4 hours after their adherence to the epithelium. However the inflammatory markers generated by these cells lead to markedly increased PCT production in the surrounding tissues.

keywords: sepsis, procalcitonin, gene expression, real time PCR

Bevezetés

A súlyos infekció, szepszis és az ezt követően kialakuló több szervet érintő elégtelen működés (multiple organ dysfunction or failure, MODS) a morbiditás és mortalitás egyik fő okozója az újszülöttkori intenzív gondozás során ⁽¹⁾. A szepszis patogenezisének tanulmányozása során egyértelművé vált hogy a szisztémás gyulladást és a szervi elégtelenségek kialakulását nem csak a nem kezelt infekció, hanem egyéb stimulusok is kiválthatják (pl. pankreatitis ⁽²⁾, trauma ⁽³⁾, égési sérülések ⁽⁴⁾). A szisztémás gyulladás jegyei, mint pl. a testhőmérséklet emelkedés, leukocitózis, tachikardia, kialakulhatnak infekciós és nem infekciós etiológiájú kórképekben is, ezért diagnózisuk nem tekinthető a szepszis érzékeny, specifikus markereinek. A szepszises betegeknél nem minden esetben mutatható ki a leukocitózis, emellett előfordulhat láz, hypotónia vagy normális testhőmérséklet mellett is.

Az infekció kimutatására a bakteriológiai tenyésztés a standard módszer a szepszis diagnózisában, azonban az infekciót okozó baktériumok vagy gombák kitenyésztése sokszor nehézkes és hosszadalmas. A vérből tenyésztett negatív hemokultúrák nem zárják ki az infekciót és több tenyésztésre is szükség lehet, amíg a pozitív hemokultúra kitenyészthető, ami hosszú időt igényelhet. Emellett a klinikai tünetek nem feltétlenül egy időben jelentkeznek a pozitív és negatív hemokultúrák kitenyésztésével. Ezért szükség van az infekció korai általános markerére, amely lehetővé teszi a szisztémás bakteriális infekció lehető legkorábbi diagnózisát. Az infekció hatására létrejövő szisztémás gyulladás jó markerének tűnik a prokalcitonin (PCT).

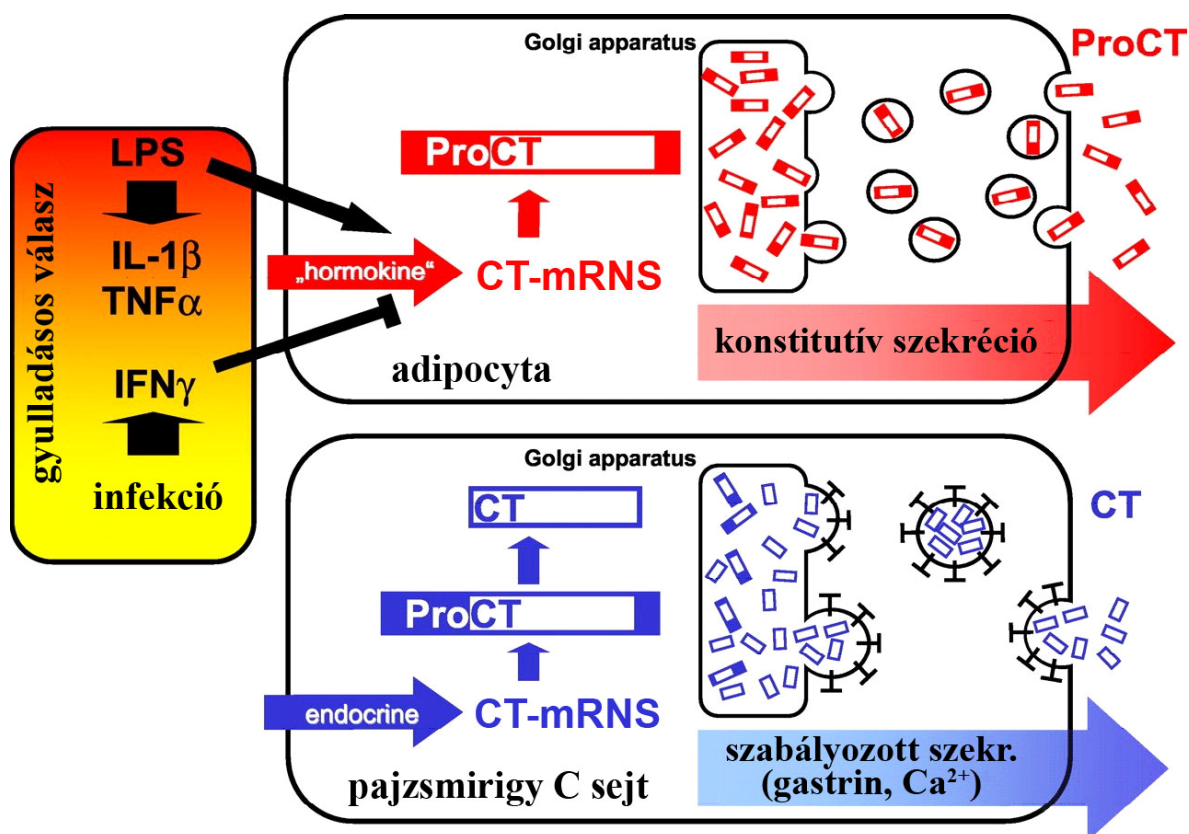
A PCT, a kalcitonin propeptidje szerepét a klinikai diagnosztikában ill. kezelésben többek között az alábbi területeken bizonyították:

- Szisztémás gyulladással járó fertőzések diagnózisa ^(5, 6)
- Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), szepszis, súlyos szepszis, szeptikus sokk differenciál diagnosztikája ^(7, 8)
- A MODS prognosztizálása ill. a betegek kezelésének kontrollja ^(9, 10)
- Bakteriális és virális infekció differenciál diagnosztikája ^(11, 12)
- A terápia ellenőrzése és a bakteriális infekció nyomon követése ^(13, 14)
- Ismeretlen eredetű láz differenciáldiagnosztikája ⁽¹⁵⁾
- Kritikus állapotú betegek monitorozása ^(16, 17, 18)

A PCT a 11-es kromoszóma rövid karján a p15.1-15.2 kromoszóma régióban található calcitonin gén terméke. A gén 6 kódoló régióból (exonból) áll, amelyről szövet specifikus módon (alternatív splicing) 2 különböző mRNS íródik le. Az 1-3 exonok közösek ezt követi a 4-es exon, amely a calcitonin szekvenciáját tartalmazza. Az 5-ös exon a calcitonin related protein (CGRP)-re specifikus szekvenciát tartalmazza. A calcitonin normális esetben a pajzsmirigy C sejtjeiben, a CGRP hipotalamusz idegsejtjeiben képződik.

A calcitonin propeptidje a PCT 116 aminosavból áll és 15.5kD méretű. A PCT a pajzsmirigy C sejtjeiben a fehérje érés során specifikus proteolízissel 3 részre hasítódik: N-terminális régió, calcitonin és katacalcin.

A procalcitonin normális esetben a plazmában alacsony koncentrációban (<0.5mg/L) van jelen. Súlyos bakteriális-, gomba-, parazita- fertőzés, sepsis hatására a procalcitonin más sejtekben is indukálódik (plazma koncentrációja akár >500mg/L is lehet) vélhetően az adipózus sejtekben, monocytákban, máj makrofágjaiban, bél, és a tüdő neuroendokrin sejtjeiben (1. ábra). Krónikus gyulladás, vírus infekció, enyhébb lokális infekció esetén szintje a plazmában nem emelkedik (valószínű a γ interferon gátló hatása miatt ⁽¹⁹⁾).



1. ábra. A procalcitonin és calcitonin expressziója gyulladásos és fiziológias körülmények között.

A procalcitonin fehérje életideje sokkal hosszabb (~30 óra), mint a gyorsan lebomló calcitoniné (~5-10 perc), ezért jól használható a laboratóriumi diagnózishoz. Vérből chemilumineszcens immún assay segítségével mutatható ki. A fehérje kimutatás előnye hogy közvetlenül a procalcitonint mérhetjük, viszont a módszer kevésbé érzékeny, mint a molekuláris genetikai polimeráz láncreakció (PCR) alapú technikák.

A vizsgálatainkban a procalcitonin mRNS expresszióját terveztük meghatározni infektós betegeknél torokvádékból vagy egyéb testnedvekből, amely lehetővé teszi a PCT szöveti (sejt szintű) kifejeződésének meghatározását. Mivel az mRNS képződése, mennyisége (expresszió) a fehérje szintézist megelőzően történik, a kórfolyamat korai szakaszában lenne így lehetőség az infektó kimutatására. Ehhez szükségünk volt egy specifikus, érzékeny, mennyiségi meghatározási módszer beállítására, amelyre a valós idejű (real time) PCR-t tartottuk legalkalmasabbnak.

Betegek és módszer

Betegek

A Gyermekgyógyászati Klinika Intenzív osztályán kezelt 8 infekciós/szepszises gyermek különböző mintáit vizsgáltuk:

- torok váladék
- torok mosó folyadék
- mellúri váladék

A váladékok procalcitonin szintjét konvencionális módon (chemilumineszcens immun assay) mértük amely során 0.2-1.8 ng/ml procalcitonin fehérje értékeket kaptunk. Két gyermek (mellkas csővezett kilózosos váladék, ill egy torokváladékban) esetében 1.5 ng/ml feletti értékeket mértünk.

RNS szeparálás

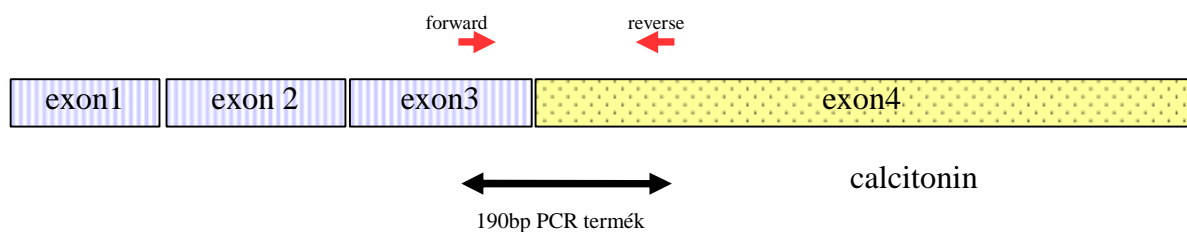
A vizsgált személyektől 1ml mellúri vagy torok váladékot 9ml mRNS stabilizáló oldatban vettünk fel. A mRNS-t mágneses üveg részecskékkel a *mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kit segítségével szeparáltuk. A kapott total RNS-t random hexamerekkel a *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas AB, Vilnius, Lithuania) segítségével írtuk át cDNS-re.

Real Time PCR

A mennyiségi analízist a Roche LightCycler készüléken végeztük. A procalcitoninra specifikus primereket és próbákat a *LightCycler probe design* programmal terveztük meg:

proCT-F	5'-TCA GTG AGG ACG AAG C-3'
proCT-R	5'-GTG TAG AAC TTG TTG AAG T-3'
proCT-P1	5'-AGC AAG AGA GAG AAG GC-fluorescein-3'
proCT-P2	5'-LCred705-CAG CCT GGA CAG CCC C-3'

A kísérleti elrendezésünket az 2. ábra szemlélteti. A primereket a 3-as és 4-es exonokba terveztük. A genomikus DNS-ből történő amplifikáció a 3-as intron hossza és a PCR program extenziós idejének rövidege miatt nem történik meg, amit agaróz gélen való futtatással is igazoltuk.



2. ábra. A prokalcitonin mRNS-ének részlete. Az 1-3-as exonok a CGRP és prokalcitoninban is megtalálhatók, a 4. exon specifikusan csak a prokalcitoninban.

Az amplifikált DNS szakaszon a konzervatív szekvenciákat és alacsony komplexitású ismétlődő DNS szakaszokat (repeateket) BLAST-al és a RepeatMasker programmal is kizártuk. A vizsgálatainkhoz a h-HPRT alacsony kópia számú house keeping gene (háztartási gén) kit-jét használtuk belső kontrollként.

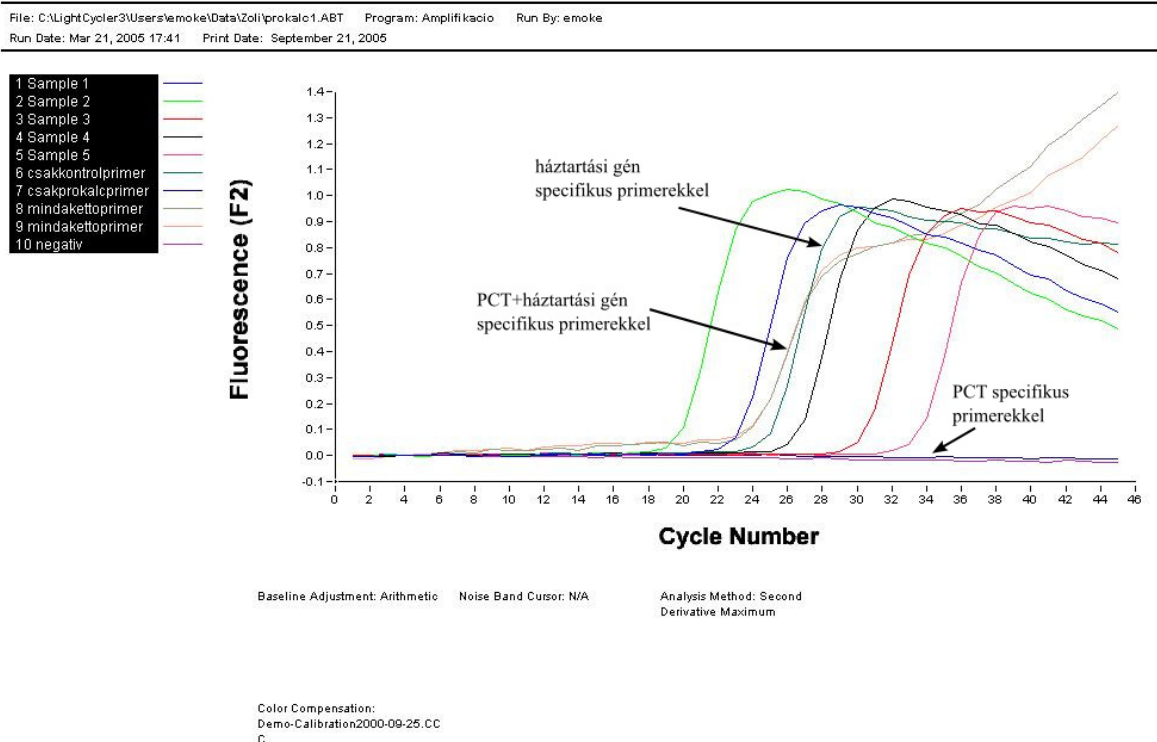
Biokémiai PCT meghatározás

A PCT kimutatását szérumból a LIA-mat system 300 luminométerrel (Biotest) végeztük. 1144 betegnél 2002-2004 között.

Eredmények

A 2002-2004 között vizsgált 1144 beteg kb 2/3-a feküdt intenzív osztályon. Kóros értéket ($>0.5\text{ng/ml}$) 2002-ben 134 betegnél mértünk, ezek átlag és szórás értéke $10.2\pm 18.6\text{ ng/ml}$ volt. 2003-ban 149 esetben, $15.9\pm 51.3\text{ ng/ml}$ értékekkel, 2004-ben 156 esetben, $27.8\pm 81\text{ ng/ml}$ értékekkel mértünk kórosan magas PCT szinteket. A szórás értékek is jelzik hogy a mérsékelten emelkedett szinttől a több százás értékekig változtak az eredmények.

A real time PCR módszerrel végzett méréseink alapján nem találtunk kimutatható mennyiségű prokalcitonin mRNA expresszió a különböző váladékokban. A torok és tüdőmosó váladékokban kimutatható volt a h-HPRT gén mRNA-e. Ez bizonyítja hogy a sejtes elemek ezen váladékokban a háztartási géneket fejezik ki (expresszálják), az RNA szeparálás, random hexameres cDNA áttírás és a real time PCR működött. A 3. ábrán egy LightCyclerrel végzett PCR amplifikáció eredménye látható, amelyen a háztartási gén külső kontrol hígítási sora, ill. egy tüdőcsövezett paciens tüdőváladékából nyert mintája látható csak a háztartási génre specifikus primerekkel, csak a prokalcitonin specifikus primerekkel és két párhuzamos mindkét primer párt tartalmazó PCR elegy felhasználásával.



3. ábra prokalcitonin mRNS kimutatása LightCyclerrel

Az F2 csatornán a hígítási sor külső kontrolja teljesen uniform módon a koncentrációnak megfelelően amplifikálódott. A mindkét primert és a h-HPRT gén primereit tartalmazó kapillárisban a háztartási gén azonos mennyisége szaporodott fel. Az F3-as csatornán amely a prokalcitonin specifikus próbák abszorpciós maximumán a prokalcitonin expressziót mérte nem kaptunk jelet. Eredményeinket agaróz géles futtatással is megerősítettük, ahol a prokalcitoninra jellemző 190bp-os DNS fragmenst nem detektáltuk.

Megbeszélés

Korábbi állat kísérletek arra utaltak hogy a PCT-nek szerepe lehet a szisztémás infekciókban lezajló káros folyamatokban ⁽¹⁹⁾, ezért fontos lehet keletkezési helyének, eredetének tisztázása humán sepszisben is. Szeptikus állat modellben generalizált

többféle szövetet érintő, nem neuroendokrin eredetű szövetekben is kimutatták a prokalcitonin képződését^(20, 21). Humán adipocita sejtkultúrákban hasonló eredményre jutottak megerősítve azt a tényt hogy a PCT pajzsmirigyen kívüli is képződik. Ezek az eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy kritikus infekciós esetekben az obez betegek tüneteinek a progressziója súlyosabb lehet⁽²²⁾. A mi retrospektív vizsgálataink a BMI indexek hiánya miatt ezen adatok alátámasztását nem tették lehetővé.

A szérumban prokalcitonin szintek mérése fontos információt nyújtott a diagnosztikában. A 0.5-2 ng/ml értékeket általában politraumatizáció, égés, súlyos bakteriális (nem szepszis) infekció esetében kaptunk. Több mint 2 ng/ml PCT értékek igazolódtak bakteriális (esetleg gomba) szepszisekben, néha extrém magas (>500ng/ml) szintekkel. Normál értéket (<0.5 ng/ml) 705 betegnél mértünk, ezek háttérében krónikus gyulladások, autoimmun folyamatok, vírus infekciók vagy enyhe, esetleg közép súlyos bakteriális infekció állt.

A kvantitatív RT-PCR-os eredményeink alapján a vizsgált torok váladék, torok mosó és mellúri váladékokban is megtalálható sejtek (epithél sejtek, monocyták) nem expresszálták a prokalcitonin mRNS-ét, azonban a háztartási gén kifejeződését kimutattuk. Aktivált makrofágokban eredményeinkhez hasonlóan mások sem tudták igazolni a PCT mRNS-ének expresszióját⁽¹⁹⁾. Perifériás vér mononukleáris sejtek csak 3-5 órán keresztül termeltek a PCT-t az endothél sejtekhez történő kitapadást követően, 18 óra múlva már nem⁽²³⁾. Ugyanebben a tanulmányban nem tudtak kalcitonin mRNS-t kimutatni szeptikus betegek fehérvérsejtjeiben, bár jelentősen emelkedett volt a szérumban PCT szintjük. Azonban az aktivált makrofágok által termelt gyulladáshoz köthető mediátorok jelentős PCT termelődést váltottak ki humán adipocita sejt tenyésztésben. A betegeinktől a mintavétel későbbi időpontban történt, így adataink is igazolják a fentebb említett kutatási eredményeket. Ugyanakkor Russwurm S, és mtsai⁽²⁴⁾ vizsgálataiból kiderül az is, hogy a különböző humán szövetek különböző mennyiségben termelhetnek PCT-t, a legtöbbet a máj, tesztisz, tüdő, prosztata, vese és vékonybél. Ezen kutatások tükrében a klinikai gyakorlatban a PCT fehérje kimutatása tűnik legcélravezetőbbnek, mivel a különböző szövetekben keletkezett PCT kiválasztódik, összegződik a szérumban.

Irodalomjegyzék

1. *Natanson, C., Hoffman, W.D., Suffredini, A.F., Eichacker, P.Q., Danner, R.L.:* Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med.* 120(9), 771-83, 1994.
2. *Steinberg, W., Tenner, S.:* Acute pancreatitis. *N Engl J Med.* 330(17), 1198-210, 1994.
3. *Moore, F.A., Haenel, J.B., Moore, E.E., Whitehill, T.A.:* Incommensurate oxygen consumption in response to maximal oxygen availability predicts postinjury multiple organ failure. *J Trauma.* 33(1), 58-65; discussion 65-7, 1992.
4. *Saffle, J.R., Sullivan, J.J., Tuohig, G.M., Larson, C.M.:* Multiple organ failure in patients with thermal injury. *Crit Care Med.* 21(11), 1673-83, 1993.
5. *Karzai, W., Oberhoffer, M., Meier-Hellmann, A., Reinhart, K.:* Procalcitonin--a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection.* 25(6), 329-34, 1997.
6. *Whang, K.T., Steinwald, P.M., White, J.C., Nysten, E.S., Snider, R.H., Simon, G.L., Goldberg, R.L., Becker, K.L.:* Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(9), 3296-301, 1998.
7. *Brunkhorst, F.M., Wegscheider, K., Forycki, Z.F., Brunkhorst, R.:* Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Intensive Care Med.* 26(Suppl 2), 148-152, 2000.
8. *Schroder, J., Staubach, K.H., Zabel, P., Stuber, F., Kremer, B.:* Procalcitonin as a marker of severity in septic shock. *Langenbecks Arch Surg.* 384(1), 33-8, 1999.
9. *Al-Nawas, B., Krammer, I., Shah, P.M.:* Procalcitonin in diagnosis of severe infections. *Eur J Med Res.* 1(7), 331-3, 1996.
10. *Assicot, M., Gendrel, D., Carsin, H., Raymond, J., Guilbaud, J., Bohuon, C.:* High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.* 341(8844), 515-8, 1993.
11. *Gendrel, D., Raymond, J., Coste, J., Moulin, F., Lorrot, M., Guerin, S., Ravilly, S., Lefevre, H., Royer, C., Lacombe, C., Palmer, P., Bohuon, C.:* Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *Pediatr Infect Dis J.* 18(10), 875-81, 1999.
12. *Hatherill, M., Sykes, K., McIntyre, A.G., Murdoch, I.A.:* Procalcitonin may help differentiate disseminated herpes simplex viral infection from bacterial sepsis in neonates. *Eur J Pediatr.* 159(3), 168-9, 2000.
13. *Steinbach, G., Grunert, A.:* Procalcitonin--a new indicator for bacterial infections. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 106(3), 164-7, 1998.
14. *Viallon, A., Zeni, F., Pouzet, V., Lambert, C., Quenet, S., Aubert, G., Guyomarch, S., Tardy, B., Bertrand, J.C.:* Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic

- patients with spontaneous bacterial peritonitis: diagnostic value and relationship to pro-inflammatory cytokines. *Intensive Care Med.* 26(8), 1082-8, 2000.
15. *Lacour, A.G., Gervaix, A., Zamora, S.A., Vadas, L., Lombard, P.R., Dayer, J.M., Suter, S.:* Procalcitonin, IL-6, IL-8, IL-1 receptor antagonist and C-reactive protein as identifiers of serious bacterial infections in children with fever without localising signs. *Eur J Pediatr.* 160(2), 95-100, 2001.
 16. *Karzai, W., Meier-Hellmann, A., Reinhart, K.* Procalcitonin- An indicator of sepsis., in *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*, E.J.-L. Vincent, Editor. 247. Springer-Verlag, 1998.
 17. *Llewelyn, M., Cohen, J.:* Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med.* 27 *Suppl 1*, S10-32, 2001.
 18. *Ugarte, H., Silva, E., Mercan, D., De Mendonca, A., Vincent, J.L.:* Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 27(3), 498-504, 1999.
 19. *Linscheid, P., Seboek, D., Nylen, E.S., Langer, I., Schlatter, M., Becker, K.L., Keller, U., Muller, B.:* In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology.* 144(12), 5578-84, 2003.
 20. *Morgenthaler, N.G., Struck, J., Chancerelle, Y., Weglohner, W., Agay, D., Bohuon, C., Suarez-Domenech, V., Bergmann, A., Muller, B.:* Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res.* 35(5), 290-5, 2003.
 21. *Muller, B., White, J.C., Nylen, E.S., Snider, R.H., Becker, K.L., Habener, J.F.:* Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(1), 396-404, 2001.
 22. *El-Solh, A., Sikka, P., Bozkanat, E., Jaafar, W., Davies, J.:* Morbid obesity in the medical ICU. *Chest.* 120(6), 1989-97, 2001.
 23. *Linscheid, P., Seboek, D., Schaer, D.J., Zulewski, H., Keller, U., Muller, B.:* Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit Care Med.* 32(8), 1715-21, 2004.
 24. *Russwurm, S., Stonans, I., Stonane, E., Wiederhold, M., Lubner, A., Zipfel, P.F., Deigner, H.P., Reinhart, K.:* Procalcitonin and CGRP-1 mRNA expression in various human tissues. *Shock.* 16(2), 109-12, 2001.