

Diagnostik der Titanunverträglichkeit

Sabine Schütt und Cornelia Doebis

Titan hat im Vergleich zu anderen Metallen eine geringere allergene Potenz. Das heißt allerdings nicht, dass es für jeden verträglich und somit biokompatibel ist. Die zahlreichen Berichte von Orthopäden und auch Zahnmedizinern im Rahmen der Implantation zeigen zweifelsfrei, dass Titan lokale oder systemische Entzündungserscheinungen provozieren und fördern kann. Die Kenntnis der immunologisch zugrunde liegenden Prozesse der Titanunverträglichkeit ermöglichten die Etablierung von Testverfahren speziell für diese Fragestellung und erlauben eine umfassende diagnostische Abklärung von individuellen Titanunverträglichkeiten vor dessen Einsatz und bei bestehendem Verdacht auf proentzündliche Zusammenhänge.

Einleitung

Titan zeichnet sich durch ein hervorragendes Korrosionsverhalten aus und hat eine im Vergleich zu anderen Metallen sehr geringe allergene Potenz. Daher spielen echte zelluläre Typ IV-Sensibilisierungen bei der Titanunverträglichkeit nur eine untergeordnete Rolle. Wenn zellulär vermittelte Reaktionen auftreten, sind sogar häufiger im Titan-Implantat enthaltene Verunreinigungen wie Nickel, Vanadium oder Aluminium bzw. die in Suprakonstruktionen enthaltenen Legierungsmetalle verantwortlich. Die klassische Titanunverträglichkeit ist nach heutigem Kenntnisstand vielmehr die Folge einer gesteigerten Entzündungsantwort auf die als Abrieb freiwerdenden Titanpartikel. Nach Kontakt mit Titanpartikeln setzen Gewebemakrophagen im Rahmen der Entzündungsreaktion proentzündliche Zytokine frei. Das Ausmaß der Freisetzung proentzündlicher Zytokine ist durch Polymorphismen in den Genen dieser Zytokine determiniert und variiert somit individuell (1, 2).

In Kenntnis dieser immunologischen Vorgänge stehen derzeit folgende diagnostische Verfahren im Rahmen der Abklärung der Titanunverträglichkeit zur Verfügung: Messung der

Zytokinantwort nach Titankontakt im Titanstimulationstest, Ermittlung der individuellen genetischen Entzündungsneigung der Gewebemakrophagen und LTT-Testung auf die im Titan-Implantat oder in Suprakonstruktionen enthaltenen Metalle. Die einzelnen diagnostischen Testverfahren werden im folgenden vorgestellt und hierarchisiert in ihrer Bedeutung für die Abklärung einer Titanunverträglichkeit.

Der Titanstimulationstest erfasst die Zytokinantwort nach Kontakt mit Titanoxidpartikeln

Die häufigste Ursache der „individuellen Titanunverträglichkeit“ ist die überschießende proinflammatorische Reaktivität von Gewebemakrophagen und Gingiva-Osteoklasten nach Kontakt mit Titanpartikeln. Die durch metallischen Abrieb an der Oberfläche implantierter Titanmaterialien freiwerdenden Titanoxidpartikel erreichen eine Größe zwischen 1 und 15 µm, was vergleichbar zu Bakterien ist. Sie werden durch die Gewebemakrophagen phagozytiert und stellen für diese einen Aktivierungsreiz dar. Die durch Aufnahme der Titanoxidpartikel aktivierten Makrophagen setzen pro-entzündliche Alarmzytokine frei, im wesentlichen TNF α und Interleukin-1. Die Menge dieser in die Umgebung abgegebenen Zytokine ist Ausschlag gebend für das Ausmaß der sich am Implantat entwickelnden Entzündungsreaktion. Die wichtigsten proentzündlichen Effekte von IL1 und TNF α sind: die Stimulation und Rekrutierung anderer Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen, Aktivierung des Gefäßendothels, Induktion der Akute-Phase-Reaktion in der Leber (systemische Entzündung), zentralnervöse Induktion von Fieber, Anorexie

Kontakt:

Dr. rer. nat. Sabine Schütt
Dr. rer. nat. Cornelia Doebis
Institut für Medizinische Diagnostik MVZ GbR
Nicolaistraße 22
D-12247 Berlin
Tel. 030 77001 - 134 / 184
<http://www.zahnarzt-diagnostik.de>
email: s.schuett@imd-berlin.de
c.doebis@imd-berlin.de

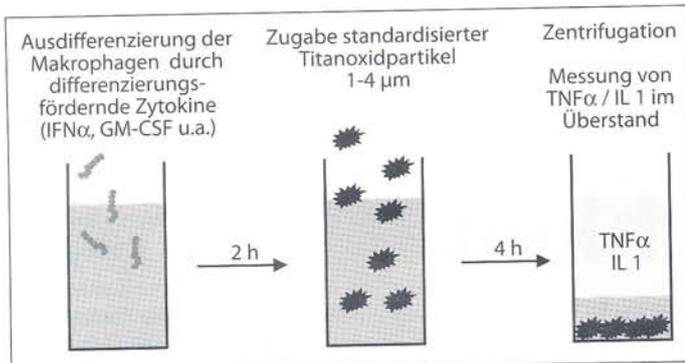


Abb. 1: Durchführung des Titanstimulationstests

und Somnolenz, Stimulation der Glukokortikoidsynthese und Osteoklastenaktivierung (gesteigerte Knochenresorption) (3, 4). Somit sind die beiden Zytokine TNF α und IL1 die Schlüsselmediatoren der lokalen aber auch der systemischen Entzündungsantwort.

Der Titan-Stimulationstest wurde für diese Fragestellung entwickelt und validiert (5). Bei diesem Vollblutstimulationstest wird untersucht, ob die Monozyten/Makrophagen des Patienten nach Kontakt mit Titanpartikeln mit einer gesteigerten Entzündungsantwort reagieren (Abb. 1). Dazu werden die im Vollblut zunächst durch differenzierungsfördernde Zytokine (u.a. INF α) ausdifferenzierten Makrophagen für 2 Stunden mit standardisierten Titanpartikeln stimuliert. Im Anschluß werden die Zytokine TNF α und IL1 im Zellkulturüberstand gemessen. Die erhöhte Freisetzung von TNF α und/oder IL1 kennzeichnet eine gesteigerte inflammatorische und proentzündliche Reaktion (Entzündungsantwort) auf Titanpartikel.

Bei Patienten mit positiven Befunden im Titan-Stimulationstest ist eine verzögerte oder gestörte Einheilung von Titanimplantaten dadurch zu erklären, dass die Makrophagen im Implantationsgebiet auf frei werdende Titanpartikel hyperaktiv reagieren und primär eine lokale, später auch eine systemische Entzündung induzieren.

Genetisch bedingte High-Responder sind Risikopatienten bei Titan-Implantationen

Die individuelle Entzündungsneigung eines Patienten ergibt sich aus der genetisch bedingten Kapazität der Makrophagen zur Sekretion der proentzündlichen Initiatorzytokine TNF α , IL1 und des gegenregulierenden Antagonisten IL1RA. Mit welcher Intensität die Zytokine nach Makrophagenaktivierung ausgeschüttet werden, wird individuell bei jedem Patienten durch Polymorphismen, d. h. Varianten in den Genen dieser Zytokine bestimmt. Manche Patienten neigen aufgrund der individuellen genetischen Entzündungskapazität der Makrophagen zu einer Überentzündung bei Reizkontakt. Grundsätzlich können Variationen (sogenannte Polymorphismen) eines Gens potentiell zu einer veränderten Transkription (Ablesen) des Gens und somit zu einer individuell unterschiedlich starken Translation (Sekretion) des kodierten Proteins führen. Für das auf Chromosom 2 liegende IL1-Gen sind 2 Polymorphismen eng mit der Produktion von IL1 assoziiert (Abb 3). Ein Polymorphismus liegt in der regulatorischen Promoterregion des IL1 α -Gens an der Position -889, der zweite liegt im IL1 β -Gen an der Position 3953. Beide Polymorphismen führen bei Vorhandensein zu einer verstärkten Synthese von IL1 α bzw. IL1 β (1). Für das ebenfalls im Interleukin-1-Gencluster liegende IL1RA-Gen ist dagegen ein Polymorphismus an der Position +2018 mit einer verminderten IL1RA-Synthese verbunden (6). Für die Sekretion von TNF α ist in zahlreichen Studien belegt, dass ein Polymorphismus an der Position -308 in der

Ärztlicher Befundbericht

Patient	Tagebuch-Nr.	Geburtsdatum	Institut für Medizinische Diagnostik Berlin Nicolaistraße 22, 12247 Berlin Tel. (030) 77001-220, Fax. (030) 77001-236
	2534877		
Eingang	16.04.08	Ausgang	17.04.08

Titan-Stimulationstest

			Normalwert
TNF-alpha nach Titanstimulation	354	pg/ml	< 20
IL1-beta nach Titanstimulation	219	pg/ml	< 15

Befund: Nachweis einer deutlichen Induktion der Entzündungszytokine TNF-alpha und auch IL1-beta nach Stimulation der Patientenblutzellen mit Titanoxidpartikeln.
Dieser Befund spricht für eine individuell erhöhte Entzündungsantwort des Patienten auf Titan.

Abb. 2: Musterbefund Titanstimulationstest

Die Testung erfolgte präventiv, d.h. im Vorfeld einer geplanten Implantation. Eine Prädisposition für eine gesteigerte Entzündung im Falle des Kontaktes mit Titanoxidpartikeln wurde eindeutig nachgewiesen.

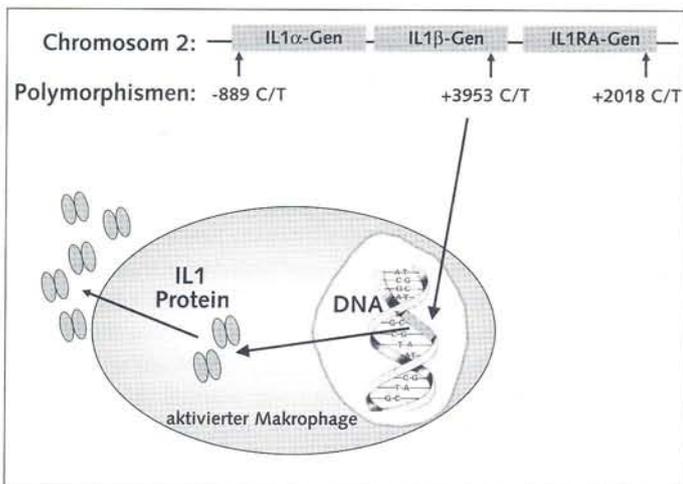


Abb 3: Das menschliche IL1-Gencluster liegt auf dem Chromosom 6 und enthält die Gene für die Zytokine IL1 α , IL1 β und IL1RA. Polymorphismen in diesen Genen determinieren, in welcher Menge das in der DNA kodierte Zytokin bei Bedarf abgelesen, d.h. in das entsprechende Protein umgeschrieben wird.

Promoterregion des Gens auf Chromosom 6 zu einer vermehrten Freisetzung von TNF α führt (1, 7, 8). Da die Polymorphismen für die proentzündlichen Zytokine IL1 α , IL1 β und TNF α eine vermehrte Synthese bewirken, kommt es bei deren Vorhandensein zu einer verstärkten Wirkung an der Zielzelle (z.B. Osteoklast) und somit zur deutlicheren Entzündungsantwort. Liegt zeitgleich der Polymorphismus im antientzündlichen IL1RA-Gen vor, wird

dieser vermindert freigesetzt, d.h. ungünstigerweise fehlt dann zusätzlich die Entzündungshemmung.

Mit einem molekularbiologischen Test ist eine Graduierung der Entzündungsneigung von Normal-Respondern (Grad 0) bis hin zu den überentzündlich reagierenden High-Respondern möglich (Grad 3 und 4). Aus der DNA des Patienten, gewonnen entweder aus Zellen einer Mundschleimhautprobe oder aus Blutzellen, werden mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) hochspezifisch die funktionell relevanten Polymorphismen enthaltenden Genabschnitte amplifiziert (vermehrt). Im Anschluß werden die Amplifikate entweder über eine DNA-Sequenzierung (hochauflösende Kapillarelektrophorese) oder über die Hybridisierung mit spezifischen DNA-Gensonden genotypisiert. Anhand der individuell vorhandenen Anzahl der IL1 α -, IL1 β -, IL1RA- und TNF α -Polymorphismen ergibt sich, in welchem Verhältnis die Zytokine nach Makrophagenaktivierung synthetisiert werden und es lässt sich ein Grad der Entzündungsneigung des Patienten von Grad 0 bis Grad 4 bestimmen.

Der Fakt, dass Titanoxidpartikel, wie bereits erwähnt, einen signifikanten Aktivierungsreiz für Makrophagen darstellen, erklärt, dass die genetisch bedingte individuelle Entzündungsneigung eines Patienten nachweislich einen unabhängigen Risikofaktor für die primäre oder sekundäre aseptische Implantitis nach Einbringung von Titanmaterialien darstellt. IL1 und auch TNF α haben stimulierende Effekte auf Osteoklasten (vermehrter Knochenabbau) und hemmende Wirkung auf Osteoblasten (gehemmter Knochenaufbau). Somit wird nach Kontakt zu

Ärztlicher Befundbericht			
Patient		Tagebuch-Nr.	Geburtsdatum
		2532233	
Eingang	05.04.008	Ausgang	08.04.08
Genetische Entzündungsneigung			
Zytokinpolymorphismen		GRAD 4	
IL1 α	-889	CT	
IL1 β	+3953	CT	
IL1RN	+2018	TC	
TNF α	-308	AA	
Die nachgewiesene Genotypkonstellation geht einher mit einer erhöhten Produktion der entzündungsfördernden Zytokine TNF α und IL1 bei gleichzeitiger Erniedrigung des entzündungshemmenden IL1-Rezeptorantagonisten. Dies prädisponiert bei vorhandenem Entzündungsreiz für eine sehr stark erhöhte Entzündungsaktivität (GRAD 4).			
<div style="border: 2px solid gray; padding: 5px; display: inline-block; font-weight: bold; font-size: 1.5em;">GRAD 4</div>		abziehbarer Aufkleber für die Patientenakte	

Abb. 4: Musterbefund Genetische Entzündungsneigung

Nachweis einer High-Responder Grad 4-Konstellation. Ein genetischer Entzündungsgrad 3 oder 4 stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die primäre oder sekundäre aseptische Implantitis nach Einbringung von Titanmaterial dar.

Titanpartikeln bei High-Respondern, da sie vermehrt IL1 ausschütten, das Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und -aufbau zu Gunsten der destruktiven Vorgänge verschoben, was die knöcherne Integration verzögert. In einer Studie hatten bis zu 50 % der IL1-Risikoallel-Träger Implantatkomplikationen, wobei der Attachmentverlust im Recall bis zu 3fach höher war (9). Auch in der Studie von McGuire et. al war die Wahrscheinlichkeit, während der Erhaltungsphase weitere Zähne zu verlieren, bei Vorliegen des Risiko-Genotyps um das 2,7fache erhöht (10). In zahlreichen weiteren Untersuchungen und Studien wurde gezeigt, dass das Auftreten der High-Responder-Genkonstellation mit der einhergehenden vermehrten Synthese entzündungsfördernder Mediatoren mit einem erhöhten Risiko für parodontale Erkrankungen assoziiert ist (11, 12, 13).

Die Kenntnis des Entzündungsgrades ist daher ein wertvolles Instrument für die Prognoseeinschätzung vor Titanimplantationen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass der Titan-Stimulationstest eine enge Korrelation zur genetisch bedingten Entzündungsneigung zeigt. So haben Patienten mit Entzündungsgrad 3 und 4 (High-Responder) in ca. 90 % der Fälle einen positiven Titan-Stimulationstest und sind *per se* als Risikopatienten anzusehen. Ein Entzündungsgrad 0 oder 1 geht dagegen nur selten mit einem positiven Titan-Stimulationstest einher. Der enge Zusammenhang

bestätigt, dass diese beiden Schlüsselzytokine TNF α und IL1 kausal an der Titan-induzierten Entzündungsreaktion und dem Verhältnis zwischen Knochenauf- und abbau beteiligt sind. Ein Grad-3 oder Grad-4-Ergebnis stellt allerdings im Unterschied zur Allergie keine absolute Kontraindikation für die Einbringung von Titan dar, es sollten aber Alternativen erwogen sowie Recall- und Prophylaxeintervalle enger gesetzt werden.

Die Tatsache, dass aus unseren bisherigen Erfahrungen lediglich eine ca. 90 %ige Übereinstimmung zwischen Titan-Stimulationstest und dem Entzündungsgrad besteht, macht deutlich, dass zusätzlich weitere bisher unbekannte Faktoren kausal von Bedeutung sind. Diskutiert werden hier ähnliche Polymorphismen an den Zytokinrezeptoren auf Osteoklasten oder die Regulationen der Zytokinexpression auf der Ebene der mRNA und Proteinsynthese. Für TNF α ist bekannt, dass neben der Regulation der Synthese auf transkriptioneller Ebene (z.B. durch Polymorphismen) die freigesetzten Mengen an TNF α auch auf Ebene der Translation und des Proteinprocessings gesteuert bzw. kontrolliert werden (14, 15). So wird TNF α während der Biosynthese als 26 kD-Protein auf der Zelloberfläche exprimiert und dann durch enzymatische Abspaltung erst in seine lösliche bioaktive 17 kD-Form umgewandelt. Diese Abspaltung erfolgt u.a. durch Matrix-Metalloproteinasen (z.B. TACE, Adamolysin etc) (16, 17). Somit hat deren Restriktionsaktivität Einfluss auf die

Patient		Tagebuch-Nr.	Geburtsdatum
		2590184	
Eingang	12.12.08	Ausgang	20.12.08
Untersuchung/Material: Lymphozytentransformationstest Implantatmetalle (Heparinblut)			
		SI	SI
Chrom		1,3	Vanadium
Gold		1,5	Titan
Palladium		1,0	Molybdän
Nickel		7,5	Indium
Kobalt		5,3	Aluminium
Gallium		1,1	Platin
Silber		1,1	Iridium
Leerwert (Negativkontrolle)	1047	Normalwert < 3000 cpm	
Antigenkontrolle	14559 cpm	13,9	
Mitogenkontrolle (PWM)	37362 cpm	35,7	
Ergebnisse von >3 bei der Antigenkontrolle (Tetanus/CMV/Influenza) und > 8 bei der Mitogenkontrolle PWM sichern die Auswertbarkeit der Untersuchung.			
Befund:			
Im LTT Nachweis einer zellulären Sensibilisierung im Sinne einer Typ IV- Immunreaktion gegenüber Kobalt und Nickel.			

Abb. 5: LTT-Befund Implantatmetalle
LTT-Befund einer 56-jährigen Frau vor geplantem Hüftkopf-Ersatz. Der Befund ist in sofern wichtig, als das hier keine Kobalt- oder Nickel-haltige Legierung verwendet werden darf. Bei einem Titanimplantat muss sichergestellt sein, dass dieses Nickel-frei ist.

Menge an sezerniertem TNF α . Das kann bedeuten, dass in einigen Fällen trotz genetisch bedingter gesteigerter Synthese an TNF α -Vorläuferprotein durch z.B. verminderte Aktivität der Metalloproteinasen dennoch normale TNF α -Spiegel an der Zielzelle wirken.

Im Vorfeld von Implantationen sollte daher neben dem Titan-Stimulationstest immer auch die genetisch bedingte Entzündungsneigung bestimmt werden. Zudem wird die Genetik nicht beeinflusst von aktuellen antientzündlichen oder immunsuppressiven Therapien oder von möglichen systemischen Entzündungszuständen. Vor allem aber kann die Bestimmung des genetisch bedingten Entzündungsgrades zur Abklärung grenzwertiger Titan-Stimulationsteste herangezogen werden.

Was bedeutet ein positives Ergebnis im Titan-Stimulationstest oder ein Entzündungsgrad 3 oder 4 ?

Ein auffälliges Ergebnis in einer der beiden Untersuchungen kennzeichnet das Vorliegen einer Prädisposition für eine aseptische Implantitis, welche mit einem primären oder sekundären Implantatverlust verbunden sein kann. Es ist nicht gleichzusetzen mit einer Allergie, bei der das betroffene Allergen grundsätzlich zu meiden wäre. Einige Autoren gehen davon aus, dass bei einem positiven Titan-Stimulationstest die Gefahr eines Implantatverlustes ungefähr dem Risiko eines starken Rauchers entspricht. Ein positiver Titan-Stimulationstest stellt also für sich allein noch keine absolute Kontraindikation für ein Titanimplantat dar. Es sollten aber in diesem Fall Alternativen kritisch geprüft und prophylaktische Maßnahmen intensiviert werden: Einbringung schonend, keine Sofortimplantation, keine zeitgleichen Mehrfachimplantationen, vorherige Herdsanierung, anti-entzündliche Maßnahmen, Raucherentwöhnung, bis 3 Wochen nach Implantation, Vermeidung jeglicher Immunstimulation.

Sollte zusätzlich der LTT im Vorfeld einer Implantation oder bei Verdacht auf Titanunverträglichkeit durchgeführt werden?

Typ IV-Sensibilisierungen auf Titan sind ausgesprochen selten. Die Ursache ist, dass ionisches Titan im mittleren pH-Bereich unmittelbar nach Freisetzung oxidiert wird. Die oxidierten Titanpartikel sind im Gegensatz zu anderen Metallionen nicht mehr in der Lage, Metall-Protein-Komplexe zu bilden. Definitionsgemäß liegt eine Typ IV-Sensibilisierung auf ein Metallion dann vor, wenn der Organismus gegen einen Metall-Protein-Komplex (ein sogenanntes Hapten) spezifische T-Lymphozyten bildet. Da oxidiertes Titan nicht über Modifikation von Proteinen zum Allergen werden kann, sind echte zelluläre Typ-IV-Sensibilisierungen auf Titan eher unwahrscheinlich. Daher steht der LTT auf Titan in seiner Bedeutung eindeutig hinter den beiden vorgenannten Untersuchungen zurück. Allerdings sind in Einzelfällen Titansensibilisierungen beschrieben, weshalb vor allem bei präventiven Untersuchungen die parallele LTT-Testung erwogen werden sollte. Im Hinblick auf Typ IV-Sensibilisierungen sind allerdings verunreinigende Metalle mit Sicherheit von Relevanz. In einigen Titanimplantaten sind

Spuren an Nickel, Vanadium oder Aluminium enthalten. Zusätzlich sollte man auch an Legierungsmetalle der Suprakonstruktionen oder an die Befestigungszemente denken. Bei letzteren sind insbesondere die acrylathaltigen Zemente bedeutsam, welche nativ im LTT getestet werden können (vorbereitete ausgehärtete Zementprobe mit einsenden).

Nachweise

- (1) POCIOT F, MØLVIG J, WOGENSEN L, WORSAAE H, NERUP J. (1992): A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 22(6): 396-402.
- (2) HEESSEN M, KUNZ D, BACHMANN-MENNENGA B, MERK HF, BLOEMEKE B. (2003): Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha-308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: Association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. *Crit Care Med.* 31(1): 211-214.
- (3) KSONTINI R, MACKAY SL, MOLDAWER LL. (1998): Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg.* 133(5): 558-567.
- (4) LAURINCOVA B. (2000): Interleukin-1 family: From Genes to human disease. *Review. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 143: 19-29.
- (5) DÖRNER T, VON BAEHR V et al. (2006): Implant-related inflammatory arthritis. *Nature Clin Pract Rheumatol.* 2(1): 53-56.
- (6) WITKIN SS, GERBER S, LEDGER WJ. (2002): Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis.* 34(2): 204-209.
- (7) LOUIS E, FRANCHIMONT D, PIRON A et al. (1998): Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol.* 113(3): 401-406.
- (8) WILSON AG, SYMONS JA, MCDOWELL TL, MCDEVITT HO, DUFF GW. (1997): Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(7): 3195-3199.
- (9) FELOUTZIS A, LANG NP, TONETTI MS et al. (2003): IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implants Res.* 14(1): 10-17.
- (10) MCGUIRE MK, NUNN ME. (1999): Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol.* 70(1): 49-56.
- (11) KORNMAN et al. (1997): The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 24(1): 72-77.
- (12) VERGOPOULOS A, VON BAEHR V, ZALICKOVA L, MÜLLER C, KLEINERT T. (2004) Genetische Polymorphismen im Interleukin-1-Cluster als Parameter für der Erfolg der Er:YAG-Laser-Therapie bei Patienten mit Parodontitis. *LaserZahnheilkunde.* 4/04: 235-243.
- (13) HODGE P, MICHALOWICZ B. (2000): Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Review. Periodontol.* 26: 113-134.
- (14) BEUTLER B, KROCHIN N, MILSARK IW, LUEDKE C, CERAMI A. (1986): Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science.* 232: 977-980.
- (15) HAN J, BROWN T, BEUTLER B. (1990): Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med.* 171(2): 465-475
- (16) MOSS ML, JIN SL, MILLA ME et al. (1997): Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385(6618): 733-736.
- (17) BLACK RA, RAUCH CT, KOZLOSKY CJ et al. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618): 729-733.