

## ОСОБИНЕ ЋЕЛИЈА „ПРИРОДНИХ УБИЦА”

Владимир ЈУРИШИЋ

Медицински факултет, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац

## КРАТАК САДРЖАЈ

Ћелије „природне убице“ (*Natural Killer Cells* – *NK* ћелије) представљају 10-15% популације лимфоцита периферне крви и имају морфологију великих, грануларних лимфоцита (*Large Granular Lymphocytes* – *LGL*). Везују и уништавају ћелије инфициране вирусима и малигно трансформисане без претходне сензибилизације, а такође учествују у регулацији хематопоезе, процесу репродукције и бројним имунолошким активностима *in vivo* (одбрана у инфекцији микоплазмом и гљивицама). На основу резултата многих студија сматра се да лимфоцити периферне крви показују активност *NK* ћелија, док се имунофенотипски дефинишу као: *CD3+*, *TCR-*, површински *Ig-*, *CD56+*, *CD16+*, *CD94/NKG2D+*, *CD158a+*, *D158b+*, *CD161+ FasL+*. Активност *NK* ћелија се изражава одређивањем процента лизираних циљних туморских ћелија (*K-562*, *MOLT*, *Daudi*) које су претходно обележене радиоактивним хромом или на основу ослобађања унутарћелијских ензима (лактат-дехидрогеназа – *LDH*). *NK* ћелије су способне за двојну цитолитичку активност. Једна је спонтана – цитотоксичност независна од антигена главног хистокомпатибилног комплекса (*MHC*), док је друга врста активности ћелијска цитотоксичност посредована антителима (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* – *ADCC*). *NK* ћелије после активације процесом егзоцитозе ослобађају из својих гранула поједине ензиме: перфорин, серин-естеразу 1 и 2 (гранзим *A* и *B*), хондроитин-сулфат, фосфолипазу *A*<sub>2</sub> и друге литичке супстанције и уништавају малигно трансформисане ћелије путем некрозе. Међутим, несекреционим механизмом активацијом преко *TNF* (*Tumour Necrosis Factor*) рецептора *NK* ћелије своје ефекторске механизме испољавају и процесом апоптозе. Активност *NK* ћелија је смањена у разним туморима, у зависности од стадијума болести.

**Кључне речи:** *NK* ћелије; имунофенотип; активација; ефекторски механизми; апоптоза; некроза

## УВОД

Ћелије „природне убице“ (*Natural Killer Cells* – *NK* ћелије) представљају 10-15% популације лимфоцита периферне крви и имају морфологију великих, грануларних лимфоцита. Ове ћелије препознају и уништавају ћелије инфициране вирусима и малигно трансформисане [1-5], а имају улогу и у регулацији хематопоезе, као и у многим имунолошким активностима (Табела 1).

*NK* ћелије потичу из матичних ћелија хематопоезе. На диференцијацију *NK* ћелија стромалне ћелије костне сржи имају утицаја преко производње појединих цитокина, интерлеукина 2, 3 и 7 (*IL-2*, *IL-3*, *IL-7*) [6-10]. Хормони тимуса међају активност *NK* ћелија код мишева [11], док су у тимусу људског фетуса идентификоване незреле *NK* ћелије [12]. После изласка из костне сржи, већина *NK* ћелија циркулише у периферији или мигрира до слезине, где се налази 36% од укупног броја ових ћелија, док их је само мало у тимусу и лимфним чворовима здравих особа [13].

ТАБЕЛА 1. Биолошке улоге *NK* ћелија.TABLE 1. Biology of *NK* cells.

1.	Антитуморска активност Antitumor activity
2.	Активност према ћелијама инфицираним вирусима Activity against viral infected cells
3.	Улога у репродукцији Role in reproduction
4.	Улога у имунорегулацији Immunoregulatory role
5.	Улога у регулацији хематопоезе Role in regulation of hematopoiesis
6.	Повезаност са функцијом нервних ћелија Association with neural cell function

ПОВРШИНСКИ АНТИГЕНИ  
ЉУДСКИХ *NK* ЋЕЛИЈА

Највише коришћен антигени за идентификацију *NK* ћелија, као и у процесима изоловања пречишћене популације су: *CD16*, *CD56* и *CD57* молекуле, мада се данас интензивно испитују и друге мембранске молекуле неопходне за активацију, као потенцијални рецептори.

*CD16* (*FcγRIII*) антиген ниским афинитетом везује *Fc* регион имуноглобулина *G*, и то поткласе *IgG*<sub>1</sub> и *IgG*<sub>3</sub>. Овај антиген је гликозиран полипептид, молекулске тежине 50-60 *kD*, који се јавља у два облика. *FcγRIIIA* се налази на 80-90% *NK* ћелија, а врло мало на неутрофилима, еозинофилима, неким деловима моноцита, *T* ћелијама, као и ткивним макрофагима, док се *FcγRIIIB* налази само на неутрофилима [14]. *FcγRIIIA* молекул је повезан нековалентном везом са *CD3ζ* ланцем на *NK* ћелијама. Скоро 10% *NK* ћелија периферне крви које су *CD16+* су *CD56+* [15].

*CD56* антиген је испољен на мирујућим и активираним *NK* ћелијама периферне крви, као и на активираним ћелијама костне сржи и слезине. Овај антиген постоји и на *T* цитотоксичним лимфоцитима, који испољавају цитотоксичну активност без учешћа главног хистокомпатибилног комплекса (*MHC*) [16]. Ово је адхезивни молекул назван *NCAM* (*Neural Cell Adhesion Molecule*), испољен и на нелимфоидним ћелијама (нервне ћелије) и појединим компонентама мишићног ткива у току регенерације. Не почиње и не активира *NK* цитотоксичност, већ учествује у реакцијама приближавања молекула [17].

*CD57* антиген од 110 *kD* испољен је на 30-50% *NK* ћелија, али га експримирају и *CD3+*, *CD8+*, *T* лимфоцити и *B* ћелије.

*CD69* антиген постоји на појединим хематопоезним ћелијама, али врло мало на мирујућим *NK* ћелијама. После третмана форбол-естрима, митогенима или цитокинима *in vitro*, *NK* ћелије значајно испољавају овај антиген на својој мембрани. Сматра се да је то један од активационих антигена не само на *NK* ћелијама, већ и на другим активираним ћелијама [18, 19]. Овај показатељ може да буде од користи у имунолошком надгледању приликом процене ефекта имунотерапијских протокола, који обухватају примену интерферона или цитокина код особа оболелих од тумора. Ипак, промене у активационим антигенима не одражавају увек и функцију активности *NK* ћелија [19, 20].

Популација лимфоцита периферне крви (заступљена са мање од 5%) фенотипски представљена као *CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>* показује *MHC* независну цитотоксичност. Како *CD3* комплекс, састављен од пет полипептидних ланаца, за активацију захтева *T* ћелијски рецептор (*TCR*), који *NK* ћелије не испољавају [20], ова популација не припада класичним *NK* ћелијама. На основу многих података сматра се да *NK* ћелије имају имунофенотипске одлике: *CD3<sup>+</sup>, TCR<sup>-</sup>, површински Ig<sup>-</sup>, док су CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup>(NKR-P1), NKp46, NKp30, NKp44, p58.1, p58.2, p70, p140, CD94 и CD94/NKG2D: CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>, CD94/NKG2 A, B, C<sup>+</sup> (препознају класичне HLA-A, B, C и не класичне HLA-E и HLA-G антигене), FasL<sup>+</sup> (Apo-1, CD95 – апоптотски лиганд).*

### ОДЛИКЕ ЦИТОЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ *NK* ЋЕЛИЈА

Функционална активност *NK* ћелија се углавном изражава одређивањем процента лизираних циљних туморских ћелија, претходно обележених радиоактивним хромом [20], или на основу ослобађања унутарћелијских ензима (лактат-дехидрогеназе – *LDH*) после њиховог лизирања [21-24]. Туморске ћелије, као што су *K-562* (добијене од болесника с хроничном мијелоидном левкемијом у бластној фази), *MOLT-4* (добијене од болесника с акутном лимфобластном левкемијом), вирусно инфициране и друге свежје туморске ћелије, могу се користити као циљне ћелије (Табела 2). Туморске *K-562* ћелије се често користе као циљна ћелијска линија, а поседују и високе вредности *LDH*, па се користе за ензимски тест за процену степена лизирања *NK* ћелија. Степен цитотоксичне активност зависи од експерименталних услова, као што су број ћелија, трајање контакта ефектор–таргет и присуство стимулационих и инхибиторних чинилаца [24-26]. *NK* ћелије су способне за двојну цитолитичку активност. Једна је спонтан

**ТАБЕЛА 2.** Циљне ћелије за испитивање *NK* активности *in vitro*.  
**TABLE 2.** Target cells for evaluation of *NK* *in vitro* activity.

1.	<i>K-562</i> ћелијска линија <i>K-562 cell line</i>
2.	<i>MOLT-4</i> ћелијска линија <i>MOLT-4 cell line</i>
3.	<i>DAUDI</i> ћелијска линија <i>DAUDI cell line</i>

на – цитотоксичност независна од антигена главног хистокомпатибилног комплекса (*MHC*), док је друга врста активности означена као ћелијска цитотоксичност посредована антителима (*ADCC*).

### Спонтана цитотоксичност

Главна особина *NK* ћелија је цитотоксичност без посредовања главног хистокомпатибилног антигена (Табела 3). Способност лизирања циљних ћелија негативно корелира с испољавањем *MHC* гликопротеина на њиховој мембрани. Ћелијске линије са смањеном површинском експресијом *MHC* молекула су често осетљивије на цитолizu него ћелије из којих су настале [27, 28]. Без обзира на интензивна истраживања, нису потпуно описани сви рецептори на *NK* ћелијама. Претпоставља се да постоје два типа рецептора: један који доводи до окидања цитолитичке активности, а други који блокира ову активност [29]. За антигенске структуре испољене на *NK* ћелијама које су одговорне за окидање спонтане цитотоксичности претпоставља се да су активациони рецептори. Једна таква структура је *NK1.1* антиген на *NK* ћелијама миша, а други такав описан рецептор је полипептид из суперфамилије лектина типа *C* – *NKR-P1* – на *NK* ћелијама пацова [30, 31]. Поједине секвенце ових олигосахарида на лигандима или један лиганд полиморфне структуре после повезивања с одговарајућим рецептором покреће цитолитичку активност усмерену према *NK* осетљивим циљним ћелијама [32]. За ћелијски површински антиген *Ly-49*, испољен код субпопулације *NK* ћелија код мишева, претпоставља се да преноси инхибиторне сигнале. *Ly-49* се специфично везује за циљне ћелије које испољавају молекуле *I* класе *MHC*, а резултат ове интеракције је резистенција циљних ћелија на цитолizu [33].

Нови радови показују да високо полиморфне молекуле *HLA-A, B, C, D* и *E*, *MHC* класе *I*, као и *CD94* антигенске структуре и *KIR* (*Killer Immunoglobulin-Like Receptor*) на циљним ћелијама одређују активацију или инхибицију *NK* ћелија. Лигација *KIR* молекула или промена димеризованог облика *CD94* молекула је кључ за стимулацију или инхибицију *NK* ћелија. Претпоставља се да су инхибиторни сигнали на циљним ћелијама доминантни у односу на активационе и да је то начин на основу којег се здраве ћелије штите од аутоимунског лизирања сопственим *NK* ћелијама. Када настане компромитовање *MHC* молекула класе *I* услед инфекције или малигне трансформације, онда ове ћелије постају осетљиве на лизирање које врше *NK* ћелије. Промена експреси

**ТАБЕЛА 3.** Особине активације *NK* ћелија.  
**TABLE 3.** Characteristics of *NK* cell activity.

1.	У оквиру једног сата без претходне имунизације For one hour without prior sensitisation
2.	Боља цитолiza без испољених <i>MHC</i> антигена Higher activity without <i>MHC</i> antigen expression
3.	Не показују клонску специфичност Without clonal specificity
4.	Постојање активационих и инхибиторних рецептора Expression of activation and inhibitory receptors

је и осталих молекула, као што су *CD158a* и *CD158b*, уочено је током активације литичке функције *NK* ћелија [34].

Осим досад описаних структура на *NK* ћелијама, показано је да неспецифичне адхезионе молекуле из фамилије интегрин имају значајну улогу у цитотоксичности. Интегрини су ћелијски површински гликопротеини састављени од више од двадесет хетеродимерских комбинација  $\alpha$  и  $\beta$  субјединица, међусобно нековалентно повезаних и сврстаних у неколико фамилија (од  $\beta 1$  до  $\beta 8$ ). Везују се за различите лиганде, као што су протеини ванћелијског матрикса, фибронектин (*FN*), ламинин, колаген и витронектин, и доводе до окидања цитолитичке активности *NK* ћелија [35, 36]. Како ови адхезиони молекули имају помажућу улогу у неспецифичном везивању ефекторских и туморских ћелија, њихово одсуство или блокирање моноклонским антителима доводи до инхибиције лизирања циљних ћелија [37].

Свеже изоловане *NK* ћелије испољавају молекуле из породице  $\beta 1$  интегрин, антиген касне активације 4 (*Very Late Activation – VLA-4*) и *VLA-5*, који учествују у везивању са фибронектином, као и *VLA-6*, који везује ламинин [38], док се поједини  $\beta 1$  интегрини (*VLA-1*, 2, 3) појављују на *NK* ћелијама тек после стимулације *IL-2*. Везивање лиганда за  $\beta 3$  интегрин који конститутивно постоје на *NK* ћелијама [39] доводи до тиреозинске фосфорилације појединих унутарћелијских протеина [40]. Лимфоцитни функционални антиген 1 (*LFA-1*) из породице  $\beta 2$  интегрин, који је конститутивно испољен на *NK* ћелијама, има улогу у преносу активационих сигнала са мембране јер је примећено да после повезивања са својим одговарајућим контрарецептором *ICAM-1* (међућелијски адхезиони молекул) долази до повећања активности ензима протеин-тирозин киназе (*PTK*), као и тиреозинске фосфорилације унутарћелијских протеина, што има утицаја на пролиферацију и активацију *NK* ћелија [41].

Активација преко *CD2* антигена (*LFA-2*) је описана у литератури као алтернативни пут антиген-независног окидања цитотоксичности после везивања са одговарајућим лигандом из фамилије адхезивних молекула неурона (*NCAM*). Анализом унутарћелијских догађаја после стимулације *CD2* антигена, показано је да долази до формирања конјугата између *NK* и циљних ћелија, поларизације и егзоцитозе гранула, што све изазива повећање цитолитичке активности [42].

*CD44* је хијалорунидазни рецептор који учествује у интеракцији са фибронектином и колагеном типа I [43] и има значајну улогу у активацији *NK* ћелија. Његови цитоплазматски делови, с друге стране, везују анкирин, протеин-киназу *C* и *GTP*. Људске *NK* ћелије конститутивно испољавају овај антиген и могу усходно да регулишу његову експресију током активације интерлеукином 2 [44]. За сада се само претпоставља да постоји удруженост са цитотоксичном функцијом посредованом преко *CD16* антигена, која је, међутим, типична за цитотоксичност посредовану антителима.

На основу досадашњих истраживања може се закључити да повезивање неколико различитих структу-

ра на *NK* ћелијама с одговарајућим лигандима на циљним ћелијама регулише цитотоксичну активност.

### Цитотоксичност ћелија посредована антителима

У овом механизму ефекторске ћелије препознају *Fc* делове имуноглобулина, који облажу циљне ћелије, везују се за њих преко *CD16* антигена и доводе до цитолизе зависне од антитела (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity – ADCC*). Део цитоплазматског домена *CD16* антигена који постоји на мембрани *NK* ћелија има кључну улогу у настанку цитотоксичности зависне од антитела [45]. У тој реакцији *CD16* антиген (*Fc $\gamma$ RIIIA*) испољен на *NK* ћелијама ниским афинитетом везује *Fc* регион хуманих имуноглобулина *G*, и то посебно поткласе *IgG<sub>1</sub>* и *IgG<sub>3</sub>*. После њиховог препознавања долази до фосфорилације  $\zeta$  ланца тиреозина и активације цитотоксичних механизма [46].

Класичан пренос сигнала с рецептора који се дешава приликом спонтане цитотоксичности повезан је са хидролизом фосфолипида и стварањем диацилглицерола и инозитол 1, 4, 5 трифосфата, који активирају ензим „протеинска киназа” [47]. После активирања *NK* ћелија, поспешује се брзо коришћење унутарћелијског калцијума, као и улазак калцијума независно од волтажних канала [48]. Приликом активације *NK* ћелија у процесу зависном од антитела долази до директног активирања ензима протеин-тирозин киназе без учешћа фосфатидил-инозитол 1, 4, 5 киназног пута [49]. У пренос сигнала с рецептора на овај начин изгледа да су укључени унутарћелијски домени *CD16* антигена [50]. После активације *NK* ћелија на неки од описаних начина примећено је да у њима долази до повећања транскрипције иРНК за *IL-2* рецептор, фактор некрозе тумора алфа (*TNF- $\alpha$* ), интерферон  $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) и за друге цитокине [51].

### ЕФЕКТОРСКИ МЕХАНИЗМИ *NK* ЋЕЛИЈА

Терминални механизми у уништавању малигно трансформисаних и циљних ћелија инфицираних вирусима [52-54] испољавају своје ефекте у процесима апоптозе (програмирана ћелијска смрт) и некрозе (Схема 1). *NK* ћелије после активације процесом егзоцитозе ослобађају из својих гранула поједине ензиме: перфорин, серин-естеразу 1 и 2 (гранзим А и В), хондроитин-сулфат, фосфолипазу *A<sub>2</sub>* [55] и друге литичке супстанције (Табела 4).

Перфорин је један од литичких протеина које излучују *NK* ћелије [56], сличан је трипсину и хемотрипсину, структурно личи на *C9* компоненту комплекса, а његова молекулска тежина је око 65 *kD*. Цитолизу циљних ћелија преодоминантно остварује процесом некрозе. Цитосолни калретикулин и други калцијум-везујући протеини локализовани у гранулама вероватно стварају хелате са слободним цитосолним јонима *Ca<sup>2+</sup>* и не дозвољавају да унутар ћелија почне процес аутоцитозе [55]. Тек у међућелијском простору, у присуству калцијумских јона, око

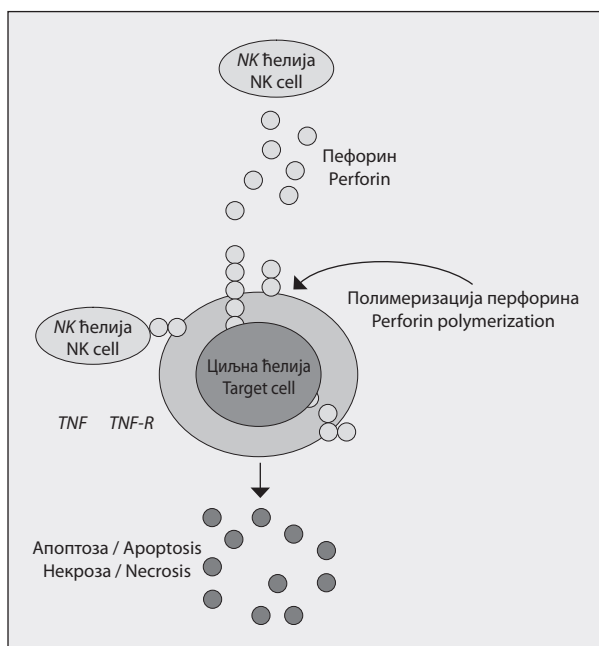


СХЕМА 1. Механизам дејства перфоруна и цитокина.  
SCHEME 1. Mechanism of perforin and cytokine action.

ТАБЕЛА 4. Ефекторске молекуле *NK* ћелија.  
TABLE 4. Effector molecules of NK cells

1.	Протеазе (трипсин, химотрипсин) Proteases (trypsin, chymotrypsin)
2.	Перфорин Perforin
3.	Серин-естеразе (гранзиме А, В) Serine esterases (granzymes A, B)
4.	Хондроитин-сулфат Chondroitine sulphate
5.	$TNF-\alpha$ , $TNF-\beta$ $TNF-\alpha$ , $TNF-\beta$
6.	Цитокини ( $IL-3$ , $CSF-GM$ , $CSF-M$ , $IFN-\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) Cytokines ( $IL-3$ , $CSF-GM$ , $CSF-M$ , $IFN-\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )

20 молекула перфоруна се полимеризује, стварајући спирале којима се праве поре у мембрани циљних ћелија. Мембранска оштећења настала после убацивања перфоруна личе на оштећења настала комплектом, а електронском микроскопијом утврђено је да је величина тако насталих пора приближно 16 nm. Кроз овако настале поре на мембрани из ћелије излазе електролити и мале молекуле мењајући осмотску равнотежу. Унутарћелијске макромолекуле које не пролазе кроз оштећења на ћелијској мембрани доводе до повећања осмотског притиска, услед чега у ћелију продире вода и настаје њено лизирање [23, 24, 56].

Поред механизма секреције, који је посредован перфорином, *NK* ћелије и другим механизма лизирају циљне ћелије.  $TNF-\alpha$  и лимфотоксин (*LT*) су главни медијатори ове солубилне литичке активности *NK* ћелија назване апоптоза [57-60].  $TNF-\alpha$  остварује своје дејство преко површинских рецептора на циљним ћелијама. Процес апоптозе је могуће индуковати преко трансмембранског протеина *Fas* (*CD95 APO-1*) рецептора, који је, због своје структуре, сврстан у заједничку породицу *TNF* рецептора. Интер-

акција одговарајућег лиганда са *Fas/APO-1* рецептором испоњеним на циљној ћелији индукује пренос сигнала за апоптотску смрт ћелије. Степен ове програмиране ћелијске смрти (апоптозе) зависи од типа ћелије, стадијума диференцијације и од ћелијског циклуса, а њену модулацију могуће је извршити факторима раста, цитокинима, хемијским агенсима, хемиотерапеутицима, као и ћелијама у непосредном контакту [61-65].

## ЗАКЉУЧАК

Проучавање и боље разумевање механизма активације *NK* ћелија и ефекторских механизма којима *NK* ћелије врше лизирање туморских ћелија даје важне податке о могућности и степену имуностимулације *in vivo*, као и за терапијско праћење током имуностимулације код особа оболелих од тумора, где ове ћелије, као главни носиоци неспецифичне имуности, испољавају смањену активност [13, 19].

## НАПОМЕНА

Овај рад је урађен током пројекта Министарства за науку Републике Србије.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lotsova E. Natural killer cells: immunobiology and clinical prospects. *Cancer Inv* 1991; 9:173-84.
2. Lebow TL, Bonavida B. Killer cell recruitment and renewal capacity of purified cytolytic and noncytolytic human peripheral blood natural killer cell subsets. *J Immunol* 1993; 150:320-9.
3. Rosenberg EB, Herberman RB, Levine PH, Halterman RH, McCoy JL, Wunderlich JR. Lymphocyte cytotoxicity reaction to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int J Cancer* 1972; 9:648-51.
4. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngenic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975; 16:230-9.
5. Abo T, Miller CA, Balch CM. Characterization of human granular lymphocyte subpopulations expressing HNK-1 (Leu-7) and Leu-11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetus, neonates and adults. *Eur J Immunol* 1984; 14:616-23.
6. Keever CA, Pekle L, Gazzola MV, Collins NH, Bourhis JH, Gillio A. Natural killer and lymphokine-activated killer cell activities from human marrow precursors: II. The effects of IL-3 and IL-4. *J Immunol* 1989; 143:3241-3.
7. Miller JS, Alley KA, McGlave P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long term culture system: identification of a  $CD34^+$ ,  $7^+$  NK progenitor. *Blood* 1994; 83:2594-601.
8. Hercend T, Takvorian T, Nowill A, et al. Characterization of natural killer cells with antileukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1986; 67:722-4.
9. Van den Brinck MRM, Boggs SS, Herberman RB, Hiserodt JC. The generation of natural killer (NK) cells from NK precursors cells in rat long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 1990; 172:303-13.
10. Guenther W, Schumm M, Buettner M, et al. NK activity of canine blood and marrow cells. *Tiss Antigens* 1994; 43:198-201.
11. Serrate SA, Schulof RE, Leonaridis L, Goldstein AL, Sztain MB. Modulation of human natural killer cells cytotoxicity, lymphokine production and interleukin 2 receptor expression by thymic hormones. *J Immunol* 1987; 139:2338-43.
12. Sanchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier L, Philips JH. Identification of a common T/NK cell progenitor in human fetal

- thymus. *J Exp Med* 1994; 180:569-73.
13. Konjević G, Jurišić V, Banićević B, Spužić I. Difference in NK cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 1999; 104:144-51.
  14. Lanier LL, Philips H. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cell. *Immunol Today* 1996; 17:86-90.
  15. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcR III-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143:3183-8.
  16. Jurišić V, Jančić-Nedeljkov R, Konjević G, Spužić I. Decrease of NK cell activity and characteristics of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in a haemochromatosis. *Haema* 2003; 6:85-8.
  17. Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu 19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 1989; 170:1757-861.
  18. Gerosa F, Tommasi M, Benati C, et al. Differential effects of tyrosine kinase inhibition in CD69 antigen expression and lytic activity induced by rIL-2, rIL-12, and rIFN- $\alpha$  in human NK cells. *Cell Immunol* 1993; 150:382-90.
  19. Konjević G, Jović V, Jurišić V, Radulović S, Jelić S, Spužić I. IL-2 mediated augmentation of NK cell activity and activation antigen expression on NK and T cell subsets in metastatic melanoma patients treated with interferon alpha and DTIC. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20:647-55.
  20. Wolf-Smidt GH, Lefterova P, Johnston V, Huhn D, Blume KG, Negrin RS. Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers. *Br J Haematol* 1994; 87:453-8.
  21. Brunner KT, Mach J, Cerrotini J, Chapius B. Quantitative assay for the lytic action of immune lymphoid cells on Cr labelled allogeneic target cells in vitro. *Immunol* 1968; 14:181-9.
  22. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 115(1):61-9.
  23. Jurišić V, Spužić I, Konjević G. A comparison of NK cell activity with effects of TNF- $\alpha$  against K-562 cells, determined by LDH release assay. *Canc Letters* 1999; 138:67-72.
  24. Jurišić V. Estimation of cell membrane alteration after drug treatment by LDH release. *Blood* 2003; 101:2894.
  25. Jurišić V, Bogdanović G, Kojić V, Jakimov D, Baltić VV. Effects of TNF- $\alpha$  on the Raji cell determined by different methods. *Tumor Biol* 2000; 18.
  26. Jurišić V, Konjević G, Donfrid M, Spužić I. Different correlation ratio between NK cell activity and spontaneous LDH release in Non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas. *Ann Haematol* 1998; 77:83.
  27. Storkus W J, Alexander J, Payne JA, Dawson JR, Cresswell P. Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2361-4.
  28. Liao NS, Bix M, Zijistra M, Jaenisch R, Raulet D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 1991; 253:199-202.
  29. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD 16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4480-6.
  30. Ryan JC, Turck J, Niemi EC, Yokoyama WM, Seaman WE. Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J Immunol* 1992; 149: 1631-5.
  31. Giorda R, Rudert WA, Vavassori C, Chambers WH, Hiserodt JC, Trucco M. NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science* 1990; 249:1298-301.
  32. Yokoyama WM. Recognition structures on natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:67-73.
  33. Yokoyama WM. Natural killer cell receptor. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:110-20.
  34. Norris S, Doherty DG, Curry M, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. Selective reduction of natural killer cells and T cells expressing inhibitory receptors for MHC class I in the livers of patients with hepatic malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52:53-8.
  35. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-5.
  36. Monzon-Garcia C, Buey-Garcia L, Majano PL, Otero MR. Integrins: structure, biological function and relevance in viral chronic hepatitis. *J Clin Invest* 1995; 25:71-8.
  37. Schmidt RE, Bartley G, Levine H, Schlossman SF, Ritz J. Functional characterization of LFA-1 antigens in the interaction of human NK clones and target cells. *J Immunol* 1985; 135:1020-9.
  38. Rabinowich H, Lin W-C, Amoscato A, Herberman RB, Whiteside TL. Expression of vitronectin receptor on human NK cells and its role in protein phosphorylation, cytokine production, and cell proliferation. *J Immunol* 1995; 154:1124-35.
  39. Collins TL, Kassner PD, Bierer EB, Burakoff SJ. Adhesion receptors in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:385-93.
  40. Sanchez-Mateos P, Campaner MR, Balboa MA, Sanchez-Madrid F. Co-clustering of beta 1 integrins, cytoskeletal proteins, and tyrosine-phosphorylated substrates during integrin-mediated leukocyte aggregation. *J Immunol* 1993; 151(7):3817-28.
  41. Kimby E, Rincon J, Patarroyo M, Mellstedt H. Expression of adhesion molecules CD11/CD18 (Leu-Cams, beta 2-Integrins), CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in B chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1984; 13:297-306.
  42. Squier KTM, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:447-52.
  43. Galandrini R, Ruggero DM, Piccoli M, Frati L, Santoni A. CD 44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J Immunol* 1994; 153:4399-407.
  44. Maenpaa A, Jaaskelainen J, Carpen O, Patarroyo M, Timonen T. Expression of integrins and other adhesion molecules on NK cells; impact of IL-2 on short-and long-term cultures. *Int J Cancer* 1993; 53:850-3.
  45. Harris DT, Travis WW, Koren HS. Induction of activation antigens on human natural killer cells mediated through the Fc- $\gamma$  receptor. *J Immunol* 1989; 143:2401-6.
  46. Liao F, Shin SH, Rhee SG. Cross-linking of Fc $\gamma$  RIII A on natural killer cells results in tyrosine phosphorylation of PLC- $\gamma$ 1 and PLC- $\gamma$ 2. *J Immunol* 1993; 150:2668-74.
  47. Alexander DR, Cantrell DA. Kinases and phosphatases in T cell activation. *Immun Today* 1989; 10:200-20.
  48. Hess DS, Oortgiesen M, Cahalan DM. Calcium oscillations in human T and natural killer cells depend upon membrane potential and calcium influx. *J Immunol* 1993; 150:2620-33.
  49. Biondi A, Paganin C, Rossi V, et al. Expression of lineage-restricted protein tyrosine kinase genes in natural killer cells. *Eur J Immunol* 1991; 21:843-6.
  50. Leibson PJ. Viewpoint: signal transduction during natural killer cell activation. *Nat Immunol* 1995; 14:117-22.
  51. Graubert TA, Ley TJ. How do lymphocytes kill tumor cells? *Clin Cancer Res* 1996; 2:785-9.
  52. Young JD, Cohn ZA. Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity, structural and functional analogies. *Adv Immunol* 1987; 41:269-75.
  53. Joag S, Zychlinsky A, Young JD. Mechanisms of lymphocyte-mediated lysis. *J Cell Biochem* 1989; 39:239-44.
  54. Jurišić V, Bumbaširević V, Konjević G, Djuričić B, Spužić I. TNF- $\alpha$  induced changes in LDH isotype profile following triggering of apoptosis in PBMC of non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Haematology* 2004; 83:84-91.
  55. Jurišić V, Kraguljac N, Konjević G, Spužić I. TNF- $\alpha$  induced changes in cell membrane antigen expression on K-562 cells associated with increased lactate dehydrogenase (LDH) release. *Neoplasma* 2005; 52(1):25-31.
  56. Jurišić V, Konjević G, Bumbaširević V, Spužić I. Morfološke promene kod kultivisanih ćelija malignih limfoma. In: Bumbaširević V, editor. 40 godina elektronske mikroskopije u Srbiji. Beograd: Elit; 1997. p.29-30.
  57. Johnson-Voelkel C, Enting JA, Wold SMW, Gooding LR, Laster MS. Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol* 1995; 154:1707-16.
  58. Suda T, Takahashi T, Goldstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis receptor family. *Cell* 1993; 75:1169-78.
  59. Jurišić V, Konjević G, Bumbaširević V, Djuričić B, Spužić I. TNF- $\alpha$  effects on induction of apoptosis on malignant lymphoma peripheral blood lymphocytes. *Archive of Studenica* 1998; 1:49-52.
  60. Grell M, Zimmermann G, Hulser D, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J Immunol* 1994; 153:1963-72.
  61. Armitage JR. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:407-13.
  62. Jurišić V, Bogdanović G, Srdić T, Kerenji A, Baltić M, Baltić VV.

- The activity of TNF-alpha on PC cells pre-labeled with CD45 and CD95 monoclonal antibodies. *Archive of Studenica* 2000; 2:56-9.
63. Konjević G, Spužić I, Jurišić V. Natural killer cell activity and its in vitro modulation by rh TNF-alpha in patients with non-Hodgkin's lymphomas. *Inter J Oncol* 1995; 7(Suppl):1010.
64. Konjević G, Spužić I, Jurišić V. In vitro effects of cytokines and cytokines receptors on the activity of NK cells. *J BOUON* 1996; 1(1):47-52.
65. Jurišić V, Bogdanović G, Srdić T, et al. Modulation of TNF-activity in tumor PC cells using anti-CD45 and anti-CD95 monoclonal antibodies. *Cancer Letters* 2004; 214:55-61.

## CHARACTERISTICS OF NATURAL KILLER CELL

Vladimir JURISIĆ

School of Medicine, University of Kragujevac, Kragujevac

### ABSTRACT

NK (natural killer) cells comprise 10%-15% of peripheral blood mononuclear cells and have morphology of large, granular lymphocytes with the central role of killing the virus-infected and malignantly transformed cells, without prior sensitization. NK cells participate in hematopoiesis regulation, reproduction processes, as well as in numerous immune system reactions *in vivo*. NK cells have immunophenotyping characteristics: CD3<sup>-</sup>, TCR<sup>-</sup>, surface Ig<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD94/NKG2D<sup>+</sup>, CD158a<sup>+</sup>, CD158b<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup>, FasL<sup>+</sup>. NK cells are functionally defined by percentage of lysed tumor cells previously labeled with radioactive <sup>51</sup>Cr or by release of intracellular enzymes (LDH-lactate dehydrogenase) from destroyed target cells. NK cells employ two mechanisms for destruction of malignant cells. The first cytotoxic mechanism is spontaneous and major histocompatibility antigen independent process, while the second mechanism is antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). After activation, NK cells release the following proteolytic enzymes:

perforin, serine esterase (granzymes A and B) chondroitin sulphate, phospholipases and other lytic molecules, and destroy malignantly transformed cells by necrotic process. However, NK cells exhibit their effector mechanisms also through apoptosis by non-secretory mechanism mediated by TNF receptor superfamily members. NK cells have stage-dependent lower activity in different tumor.

**Key words:** NK cell; immunophenotype; activation; effector mechanisms; apoptosis; necrosis

Vladimir JURISIĆ  
 Medicinski fakultet  
 Univerzitet u Kragujevcu  
 Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac  
 Poštanski fah: 124  
 E-mail: vdvd@mailcity.com