



Original Article

Induction of Mitochondrial Apoptosis and Suppression of Autophagic Pathways in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Natural Killer Cell-Derived Exosomes

Leili Aghebati-Maleki¹, Vida Ebrahimi², Siamak Sandoghchian Shotorbani^{3,4}, Ghasem Aghazadeh Balkanlou⁵, Mohammad Sadegh Soltani-Zangbar^{6*}

¹ Associate Professor, Ph.D. in Medical Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Ph.D. in Pharmaceutical Biotechnology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Associate Professor, Ph.D. in Medical Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Associate Professor, Ph.D. in Medical Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵ MD, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁶ Assistant Professor, Ph.D. in Medical Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author: Mohammad Sadegh Soltani-Zangbar, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. E-mail: soltanim@tbzmed.ac.ir

DOI: [10.66224/nkums.18.3.26](https://doi.org/10.66224/nkums.18.3.26)

How to Cite this Article:

Aghebati-Maleki L, Ebrahimi V, Sandoghchian Shotorbani S, Aghazadeh Balkanlou GH, Sadegh Soltani-Zangbar M. Induction of Mitochondrial Apoptosis and Suppression of Autophagic Pathways in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Natural Killer Cell-Derived Exosomes. J North Khorasan Uni Med Sci. 2026;18(3):26-35. DOI: 10.66224/nkums.18.3.26

Received: April 12, 2026

Accepted: June 20, 2026

Keywords:

Acute Lymphoblastic
Leukemia
Apoptosis
Autophagy
Exosomes
Natural Killer Cells

Abstract

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most common hematologic malignancies, in which treatment resistance and disease relapse remain major clinical challenges. Natural killer (NK) cells release exosomes containing cytotoxic molecules that can exert anti-tumor effects without requiring direct cell-to-cell contact. Considering the critical role of the apoptosis-autophagy balance in leukemic cell survival, the present study aimed to investigate the effect of NK cell-derived exosomes on this regulatory axis in the MOLT-4 cell line.

Methods: In this experimental study, NK cells were isolated from the peripheral blood of healthy donors using magnetic-activated cell sorting (MACS) and activated with IL-2. Exosomes were extracted from culture supernatants and characterized in terms of morphology and size. MOLT-4 cells were then treated with NK-derived exosomes for 48 h. Apoptosis was assessed by flow cytometry using Annexin V/PI staining. The expression levels of *BAX*, *BCL2*, *Caspase-9* (*CASP9*), *Beclin-1* (*BECN1*), *ATG5*, *LC3B*, and *FOXO1* were evaluated by quantitative real-time PCR.

Results: Treatment with NK cell-derived exosomes significantly increased the percentage of apoptotic cells ($P < 0.001$). Expression levels of *BAX* ($P < 0.0005$) and *CASP9* ($P < 0.0014$) were significantly upregulated, while *BCL2* expression ($P < 0.05$) was downregulated, resulting in an increased *BAX/BCL2* ratio. Concurrently, the expression of autophagy-related genes, including *BECN1* ($P < 0.013$), *ATG5* ($P < 0.009$), and *LC3B* ($P < 0.037$), as well as the transcription factor *FOXO1* ($P < 0.01$), was significantly decreased.

Conclusion: NK cell-derived exosomes reduce the survival of acute lymphoblastic leukemia cells by inducing intrinsic apoptotic pathways and suppressing autophagic signaling. These findings suggest that NK-derived exosomes may represent a novel strategy in extracellular vesicle-based immunotherapy.



القای آپوپتوز میتوکندریایی و مهار مسیرهای اتوفاژی در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد T توسط اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های کشنده طبیعی

لیلی عاقبتی ملکی^۱، ویدا ابراهیمی^۲، سیامک صندوقچیان شتربانی^{۳،۴}، قاسم آقازاده بالکانلو^۵،
محمدصادق سلطانی زنگبار^{۶*}

^۱ دانشیار، دکتری تخصصی ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۲ دکتری تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ دانشیار، دکتری تخصصی ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ دانشیار، دکتری تخصصی ایمنی‌شناسی پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۵ دکتری عمومی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۶ استادیار، دکتری تخصصی ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول: محمدصادق سلطانی زنگبار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. ایمیل:

soltanim@tbzmed.ac.ir

DOI: 10.66224/nkums.18.3.26

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۲۳
مقدمه: لوسمی لنفوبلاستیک حاد یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های خونی است که مقاومت به درمان و عود بیماری همچنان از چالش‌های اساسی آن محسوب می‌شود. سلول‌های کشنده طبیعی با ترشح اگزوزوم‌های حاوی مولکول‌های سیتوتوکسیک می‌توانند بدون تماس مستقیم، بر سلول‌های سرطانی اثر بگذارند. با توجه به نقش تعیین‌کننده تعادل میان آپوپتوز و اتوفاژی در بقای سلول‌های لوسمیک، هدف این مطالعه بررسی اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های کشنده طبیعی بر این محور تنظیمی در رده سلولی MOLT-4 بود.	تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۳۰
روش کار: در این مطالعه تجربی، سلول‌های کشنده طبیعی از خون محیطی افراد سالم به روش MACS جداسازی و با IL-2 فعال شدند. اگزوزوم‌ها از محیط کشت استخراج و از نظر مورفولوژی و اندازه تأیید گردیدند. سپس، سلول‌های MOLT-4 به مدت ۴۸ ساعت با اگزوزوم‌ها تیمار شدند. میزان آپوپتوز با فلووسایتمتری (Annexin V/PI) ارزیابی و بیان ژن‌های <i>BAX</i> ، <i>BCL2</i> ، <i>Caspase-9</i> ، <i>CASP9</i> ، <i>Beclin-1</i> ، <i>BECN1</i> ، <i>ATG5</i> ، <i>LC3B</i> و <i>FOXO1</i> با Real-time PCR سنجیده شد.	واژگان کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول‌های کشنده طبیعی اگزوزوم‌ها آپوپتوز اتوفاژی
یافته‌ها: تیمار با اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های کشنده طبیعی موجب افزایش معنی‌دار درصد آپوپتوز ($P < 0.001$) شد. بیان ژن‌های <i>BAX</i> ($P < 0.0005$) و <i>CASP9</i> ($P < 0.0014$) افزایش و بیان <i>BCL2</i> ($P < 0.05$) کاهش یافت که منجر به افزایش نسبت <i>BAX/BCL2</i> گردید. همچنین هم‌زمان، بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی شامل <i>BECN1</i> ($P < 0.013$)، <i>ATG5</i> ($P < 0.009$) و <i>LC3B</i> ($P < 0.037$) و نیز فاکتور رونویسی <i>FOXO1</i> ($P < 0.01$) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.	
نتیجه‌گیری: اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های کشنده طبیعی با القای مسیر ذاتی آپوپتوز و مهار سیگنالینگ اتوفاژی، بقای سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد را کاهش می‌دهند و می‌توانند به‌عنوان راهبردی نوین در ایمونوتراپی مبتنی بر وزیکول‌های خارج‌سلولی مطرح شوند.	

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد^۱ (ALL) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های خونی است که با تکثیر غیرطبیعی و کنترل‌نشده لنفوبلاست‌ها در مغز استخوان، خون محیطی و بافت‌های لنفاوی شناخته می‌شود و در نتیجه توقف تمایز طبیعی سلول‌های پیش‌ساز، انباشت سلول‌های نابالغ و ناکارآمد رخ می‌دهد؛ این تجمع با جایگزینی عناصر طبیعی خون‌ساز، به تظاهراتی مانند کم‌خونی، خونریزی و استعداد به عفونت منجر می‌شود [۱]. در این میان، استفاده از رده سلولی MOLT-4^۲ به‌عنوان Human T-lymphoblast Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line زمینه مطالعه مکانیسم‌ها و رویکردهای درمانی مرتبط با T-ALL را فراهم می‌کند [۲].

یکی از ویژگی‌های مهم ALL، سرکوب ایمنی ذاتی و اکتسابی و شکل‌گیری شبکه‌ای از تعاملات میان سلول‌های بدخیم و اجزای سیستم ایمنی است که در نهایت نظارت ایمنی را تضعیف و پیشرفت بیماری را تسهیل می‌کند [۳]. سلول‌های کشته شده طبیعی^۳ (NK) به‌عنوان بازوی کلیدی ایمنی ذاتی، توانایی شناسایی و حذف سلول‌های سرطانی را بدون نیاز به حساسیت قبلی دارند و از طریق ترشح IFN- γ و TNF- α و نیز القای مرگ آپوپتوتیک سلول هدف عمل می‌کنند [۴]. بااین‌حال، در ALL، تعداد و عملکرد سلول‌های NK کاهش می‌یابد؛ کاهش گیرنده‌های فعال‌کننده مانند NKG2D و NKp30 و افزایش سیگنال‌های مهار، به فرار سلول‌های لوسمیک از ایمنی کمک می‌کند [۵]. همچنین، سلول‌های ALL با ترشح فاکتورهایی مانند TGF- β و IL-10 و نیز از طریق اگزوزوم‌های مشتق از تومور می‌توانند مسیرهای فعال‌سازی و کشندگی NK را مهار کنند [۶].

در سال‌های اخیر، اگزوزوم‌ها (۳۰-۱۵۰ نانومتر) به‌عنوان حامل‌های پروتئین/لیپید و RNAهای تنظیمی، به‌منزله ابزار ارتباط بین سلولی و گزینه‌ای جذاب برای درمان‌های سلول-آزاد مطرح شده‌اند [۷]. در ALL، اگزوزوم‌ها می‌توانند نقش دوگانه داشته باشند: از یک سو، سرکوب ایمنی و از سوی دیگر، اگزوزوم‌های مشتق از NK که معمولاً حاوی مولکول‌های کشته‌دهی مانند پرفورین و گرانزیم B هستند و می‌توانند مسیرهای مرگ سلولی را در سلول بدخیم فعال کنند [۸]. از منظر مکانیسمی، آپوپتوز در درمان ALL حیاتی است و مسیر داخلی با درگیری خانواده Bcl-2 مانند Bax/Bak و فعال‌سازی آشکار کاسپازها تعریف می‌شود؛ در مقابل، افزایش پروتئین‌های ضدآپوپتوز مانند Bcl-2 و Mcl-1 می‌تواند مقاومت درمانی ایجاد کند. هم‌زمان، اتوفازی فرایندی برای بازیافت اجزای آسیب‌دیده و حفظ هموستازی است که در برخی شرایط به بقای سلول‌های لوسمیک تحت استرس کمک می‌کند [۹]. با توجه به نقش کلیدی تعادل میان مسیرهای آپوپتوز و اتوفازی در بقای سلول‌های لوسمیک و نیز ظرفیت بالقوه اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های کشته شده طبیعی در انتقال مولکول‌های تنظیمی، هنوز ابعاد دقیق اثر این وزیکول‌ها بر این محورهای مولکولی به‌طور کامل روشن نشده است.

بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر اگزوزوم‌های مشتق از

سلول‌های کشته شده طبیعی بر القای مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و تنظیم مسیرهای اتوفازی در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد T (MOLT-4) بود. همچنین، این مطالعه با این فرض انجام شد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های کشته شده طبیعی می‌توانند از طریق تنظیم هم‌زمان مسیرهای مرگ و بقا، اثرات ضدتوموری قابل‌توجهی اعمال کنند.

روش کار

طراحی مطالعه

این مطالعه به‌صورت تجربی با هدف بررسی اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های کشته شده طبیعی بر القای آپوپتوز میتوکندریایی و مهار مسیرهای اتوفازی در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد T انجام شد. در این پژوهش، پس از جداسازی سلول‌های کشته شده طبیعی از خون محیطی افراد سالم و فعال‌سازی آنها در شرایط کشت، اگزوزوم‌های ترشح شده استخراج شدند و برای تیمار رده سلولی MOLT-4 مورد استفاده قرار گرفتند. سپس، اثر این اگزوزوم‌ها بر مرگ سلولی و تغییرات مولکولی با استفاده از فلوسایتومتری و سنجش بیان ژن بررسی شد.

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و ایزولاسیون

سلول‌های NK

این مطالعه به‌مدت ۱۲ ماه در دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۳ فرد سالم بالغ (۱۸ تا ۵۰ سال) بود. معیارهای ورود شامل سلامت عمومی، نداشتن بیماری مزمن، نداشتن عفونت فعال و عدم مصرف داروهای مؤثر بر سیستم ایمنی یا داروهای شیمی‌درمانی در ماه‌های اخیر بود. از هر فرد ۲۰ میلی‌لیتر خون محیطی هپارینه جمع‌آوری شد و کلیه نمونه‌گیری‌ها پس از اخذ رضایت آگاهانه انجام گرفت.

پس از جمع‌آوری نمونه‌های خون محیطی، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی^۴ (PBMCs) به‌روش سانتریفیوژ (Hettich, آلمان) گرادیان چگالی با استفاده از فایکول (Biosera, فرانسه) با دانسیته ۱/۰۷۷g/ml جداسازی شدند. سپس، سلول‌های NK از جمعیت PBMC با استفاده از تکنیک جداسازی مغناطیسی سلولی^۵ (MACS) (Miltenyi Biotec, آلمان) ایزوله شدند. برای افزایش خلوص، در مرحله نخست سلول‌های T به‌روش گزینش منفی حذف شدند و در ادامه، سلول‌های NK به‌روش گزینش مثبت خالص‌سازی شدند. در نهایت، خلوص سلول‌های جداسازی‌شده با استفاده از فلوسایتومتری (MacQuant10، آمریکا) تأیید گردید.

فعال‌سازی و کشت سلول‌های NK

سلول‌های NK خالص‌شده در محیط RPMI-1640 (Sigma-) (Aldrich, آمریکا) فاقد اگزوزوم کشت داده شدند و برای فعال‌سازی

^۴ Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

^۵ Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)

^۱ Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)

^۲ Human T-lymphoblast cell line (MOLT-4 Cell Line)

^۳ Natural Killer Cells (NK cells)

میلی لیتر اگزوزوم بودند.

ارزیابی آپوپتوز سلولی

برای ارزیابی میزان آپوپتوز، پس از پایان دوره تیمار، سلول‌های MOLT-4 با روش رنگ‌آمیزی Annexin V/PI⁵ (BD Pharmingen، آمریکا) بررسی شدند و نمونه‌ها توسط فلوسایتومتری آنالیز شدند. این روش امکان تمایز سلول‌های زنده، سلول‌های در آپوپتوز اولیه، آپوپتوز دیررس و نکروتیک را فراهم کرد و درصد هر زیرجمعیت برای تحلیل آماری ثبت شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور بررسی تغییرات مولکولی پس از تیمار با اگزوزوم‌ها، ابتدا RNA تام سلول‌ها با استفاده از Ytzol Pure RNA (یکتا تجهیز آرما، ایران) استخراج شد. سپس، با استفاده از پرایمرهای رندم هگزامر و اولیگو DT، cDNA توسط کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آرما، ایران) سنتز شد تا برای سنجش بیان ژن‌ها در واکنش Real-time PCR مورد استفاده قرار گیرد.

سنجش بیان ژن با Real-time PCR

سنجش بیان ژن‌ها با استفاده از سیستم SYBR Green (یکتا تجهیز آرما، ایران) و دستگاه Corbett 5 plex HRM (ساخت شرکت Corbett، استرالیا) انجام شد. ژن‌های مورد بررسی شامل *BAX*، *CASP9* و *BCL2* به عنوان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز میتوکندریایی و ژن‌های *FOXO1* و *LC3B*، *Beclin1* (*BECN1*)، *ATG5* و *ACTB* نیز به عنوان ژن‌های مرتبط با اتوفازی بودند. ژن β -actin (*ACTB*) نیز به عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی داده‌ها به کار رفت. پرایمرهای پیشرو (Forward) و پیرو (Reverse) از توالی ژن‌های هدف در پایگاه NCBI طراحی شدند. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار Oligo Primer Analysis انجام شد و اختصاصیت آنها با NCBI BLAST مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، شاخص‌هایی نظیر دمای ذوب، طول پرایمر، درصد GC، احتمال تشکیل دایمر و ساختارهای حلقوی ارزیابی شدند و پس از تأیید، پرایمرها از شرکت Bioneer کره جنوبی تهیه شدند. در ادامه، محلول‌های کاری با استفاده از آب DEPC-treated آماده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

آنها، اینترلوکین-۲ با غلظت ۱۰۰ IU/mL (۱۰ ng/mL، Miltenyi Biotec، آلمان) [۱۲] به محیط افزوده شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه (Memmert، آلمان) شدند. پس از پایان زمان کشت، سوپرناتانت سلولی جمع‌آوری شد و برای استخراج اگزوزوم‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های NK

به منظور حذف سلول‌ها و بقایای سلولی، سوپرناتانت حاصل از کشت سلول‌های NK در دو مرحله سانتریفیوژ شد؛ به طوری که ابتدا در $g \times 800$ به مدت ۵ دقیقه و سپس در $g \times 2000$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از شفاف‌سازی نمونه، اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت Total Exosome Isolation (ساخت شرکت Invitrogen، آمریکا) جداسازی شدند.

شناسایی و تأیید اگزوزوم‌ها

به منظور تأیید ویژگی‌های فیزیکی و مورفولوژیک اگزوزوم‌های استخراج‌شده، از میکروسکوپی الکترونی (SEM) (TESCAN، جمهوری چک) و دستگاه اندازه‌گیری نانوذرات (DLS) (Zetasizer، Malvern Panalytical، انگلستان) استفاده شد. براساس معیارهای شناسایی، اگزوزوم‌های به دست آمده دارای محدوده اندازه‌ای مورد انتظار، یعنی حدود ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر، بودند.

کشت و تیمار سلول‌های MOLT-4 با اگزوزوم‌ها

رده سلولی MOLT-4 به عنوان مدل لوسمی لنفوبلاستیک حاد T در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS⁴ (Sigma-Aldrich، آمریکا) و در شرایط استاندارد کشت شامل ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن نگهداری شد. برای انجام آزمایش‌ها، سلول‌ها با تراکم 10^6 سلول در هر چاهک در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. سپس، برای به دست آوردن غلظت مناسب اگزوزوم برای تیمار، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های NK در غلظت‌های مختلف در بازه ۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر در هر چاهک تیمار شدند. با توجه به نتایج سمیت سلولی، غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان غلظت مناسب برای تیمار انتخاب گردید. گروه کنترل شامل سلول‌های MOLT-4 بدون دریافت اگزوزوم و گروه‌های آزمایشی شامل سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میکروگرم در

جدول ۱- توالی پرایمرها جهت انجام QRT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
ATG5	Forward	GCAGATGGACAGTTGCACACAC	130
	Reverse	GAGGTGTTTCCAACATTGGCTCA	
FOXO1	Forward	CTACGAGTGGATGGTCAAGAGC	138
	Reverse	CCAGTTCCTTCATTCTGCACACG	
LC3B	Forward	GAGAAGCAGCTTCTCTGTTCTGG	138
	Reverse	GTGTCCGTTCAACACAGGAAG	
BECN1	Forward	CTGGACACTCAGCTCAACGTCA	129
	Reverse	CTCTAGTGCCAGCTCCTTTAGC	
BCL2	Forward	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	127

⁴ Fetal Calf Serum (FCS)

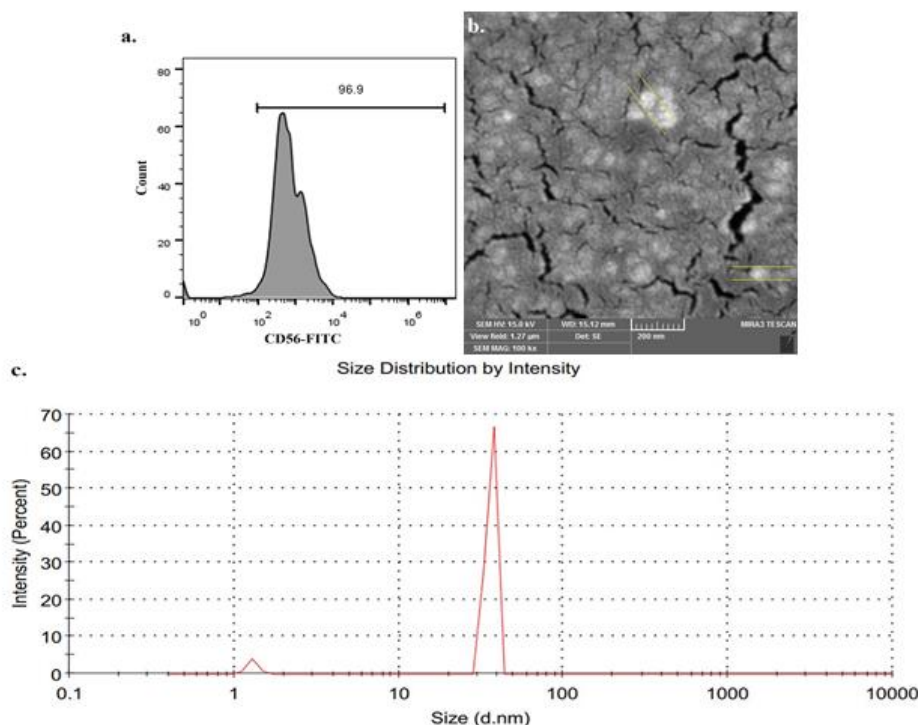
⁵ Annexin V/Propidium Iodide (PI) staining

¹ Interleukin-2 (IL-2)

² Scanning Electron Microscopy (SEM)

³ Dynamic Light Scattering

<i>BAX</i>	Reverse	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC	103
	Forward	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	
<i>CASP9</i>	Reverse	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC	129
	Forward	GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT	
<i>β-actin</i>	Reverse	CAACGTACCAGGAGCCACTCTT	135
	Forward	CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC	
	Reverse	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT	



صورت نرمال بودن داده‌ها، برای مقایسه داده‌های قبل و بعد از تیمار از آزمون paired t-test استفاده شد و در صورت غیرنرمال بودن توزیع، آزمون Wilcoxon به کار رفت. همچنین، برای مقایسه بین گروه کنترل و گروه تیمار شده از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری آماری در تمام آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نتایج بیان ژن‌ها و فلوسایتومتری به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید.

یافته‌ها

تأیید جداسازی سلول‌های NK و شناسایی اگزوزوم‌های مشتق از آنها

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های جداسازی شده دارای خلوص بالایی از سلول‌های NK بودند. همچنین، بررسی اگزوزوم‌های استخراج شده با میکروسکوپ الکترونی وجود وزیکول‌های کروی با غشای دولایه و اندازه تقریبی ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر را تأیید کرد. نتایج حاصل از آنالیز اندازه ذرات نیز توزیع یکنواخت اگزوزوم‌ها را نشان داد و عدم وجود تجمعات بزرگ یا ذرات نامنظم بیانگر خلوص مناسب اگزوزوم‌های استخراج شده بود. نتایج مربوط به خلوص سلول‌های NK و تأیید اگزوزوم‌های مشتق از آنها در شکل ۱ ارائه شده است.

شکل ۱- تأیید خلوص سلول‌های NK و اگزوزوم‌های مشتق از آن. (a) نمودار هیستوگرام نشان‌دهنده خلوص سلول‌های NK است که بیش از ۹۶٪ است. (b) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده از سلول‌های کشته شده طبیعی را نشان می‌دهد. (c) نمودار به دست آمده از DLS اندازه اگزوزوم‌های خارج سلولی جدا شده از سلول‌های کشته شده

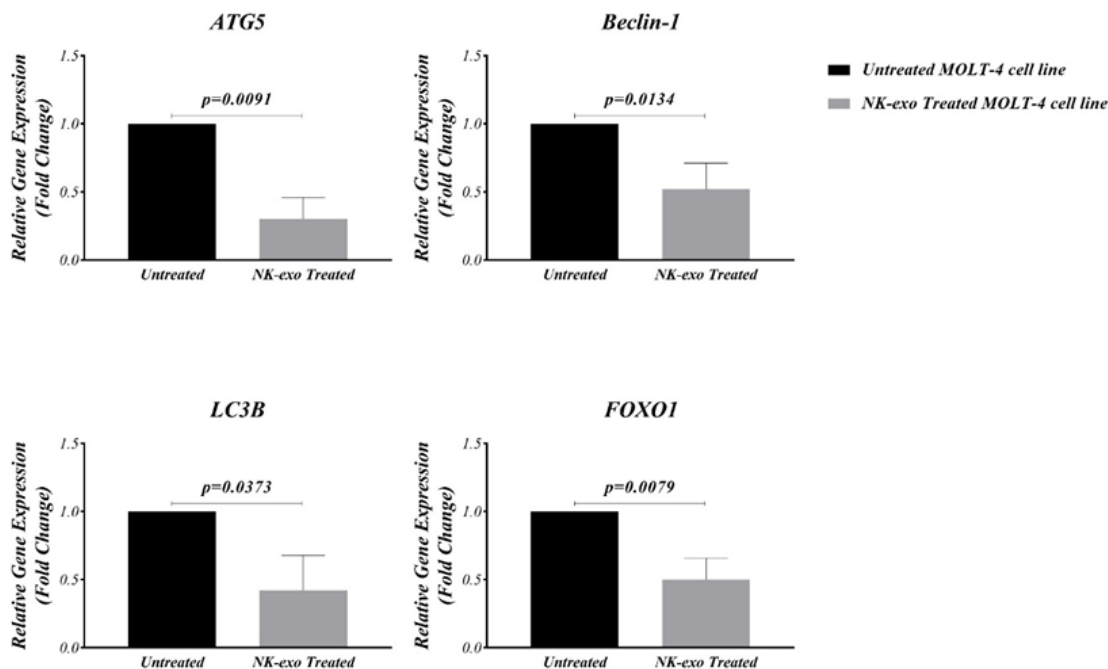
برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد، بدین صورت که ابتدا مقدار ΔCT هر نمونه از تفاضل مقدار CT^1 ژن هدف و ژن مرجع محاسبه گردید. سپس، مقدار $\Delta\Delta CT$ با محاسبه اختلاف ΔCT گروه تیمار نسبت به ΔCT گروه کنترل تعیین شد. در نهایت، سطح بیان نسبی ژن‌ها براساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. در این روش، CT بیانگر تعداد سیکل‌های لازم برای رسیدن شدت فلورسانس به آستانه قابل تشخیص بوده و ژن مرجع به عنوان کنترل داخلی جهت نرمال‌سازی داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیزهای آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌ها به صورت کمی ثبت و برای مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه تحلیل شدند. در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و اتوفازی و نیز میزان آپوپتوز سلولی به عنوان شاخص‌های اصلی اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های NK در نظر گرفته شدند.

داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین گزارش شدند و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. در

¹ CT: Cycle Threshold



است ($P < 0.009$).

میزان بیان ژن *ATG5* از 1.00 ± 0.11 در گروه کنترل به 0.30 ± 0.05 در گروه تیمار شده کاهش یافت. در راستای یافته‌های فوق، سطح بیان ژن *LC3B* نیز در سلول‌های تیمار شده به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت ($P < 0.037$). بیان ژن *LC3B* نیز از 1.00 ± 0.09 در گروه کنترل به 0.40 ± 0.08 در گروه تیمار شده رسید. در ادامه، برای بررسی تنظیم‌کننده‌های بالادستی مسیر اتوفاژی، بیان فاکتور رونویسی *FOXO1* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که سطح بیان *FOXO1* در سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌های NK به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($P < 0.01$). میزان بیان ژن *FOXO1* در گروه کنترل 1.00 ± 0.10 و در گروه تیمار شده 0.46 ± 0.06 گزارش شد. نتایج این بخش در شکل ۲ ارائه شده است.

اثر اگزوزوم‌های NK بر بیان ژن‌های کلیدی مسیر اتوفاژی

نتایج qRT-PCR نشان داد که تیمار سلول‌های MOLT-4 با اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های NK منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های مرتبط با مسیر اتوفاژی شد. نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن نشان داد که سطح بیان *BECN1* در سلول‌های MOLT-4 تیمار شده با اگزوزوم‌های NK در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته است ($P < 0.013$). میزان بیان نسبی ژن *BECN1* در گروه کنترل 1.00 ± 0.08 و در گروه تیمار شده 0.54 ± 0.07 بود که کاهش معنی‌داری را نشان داد.

در ادامه بررسی‌ها مشخص شد که بیان ژن *ATG5* نیز در سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌های NK به‌طور معنی‌داری کاهش یافته

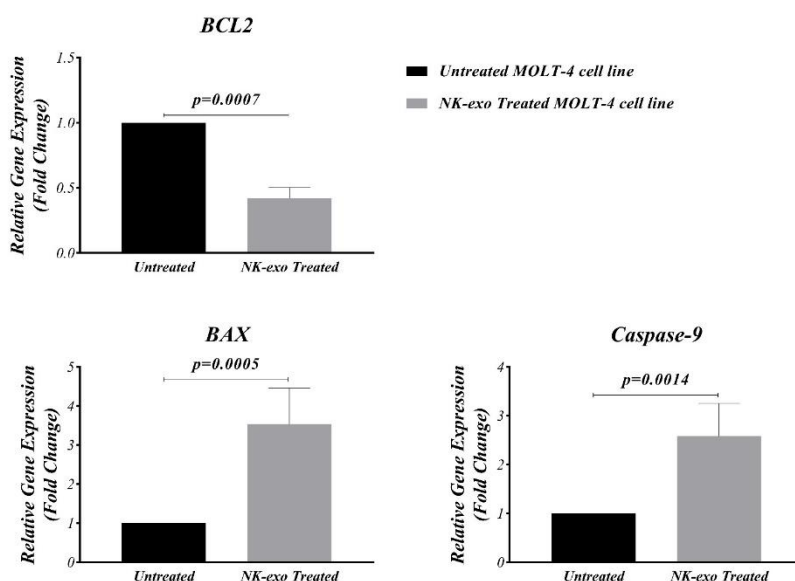
شکل ۲ - بررسی بیان ژن‌های اتوفاژی (*FOXO1* و *LC3B*, *ATG5*, *Beclin-1*) در سلول‌های MOLT-4 تیمار شده با اگزوزوم‌های NK با استفاده از Real-time PCR. کاهش معنی‌دار بیان این ژن‌ها نشان‌دهنده مهار مسیر اتوفاژی است. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردیده است.

اثر اگزوزوم‌های NK بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیر میتوکندریایی آپوپتوز

برای بررسی تأثیر اگزوزوم‌های NK بر مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، بیان ژن‌های کلیدی مسیر آپوپتوز شامل ژن‌های *BCL-2* و *CASP9* اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که سطح بیان ژن *BAX* در سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌های NK افزایش معنی‌داری داشته است ($P < 0.0005$)، به‌طوری که میزان بیان نسبی آن از 1.00 ± 0.12 در گروه کنترل به 2.84 ± 0.31 در گروه تیمار شده رسید.

در مقابل، بیان ژن *BCL-2* که یک پروتئین ضدآپوپتوتیک است، در گروه تیمار شده کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). بیان ژن *BCL-2* از 1.00 ± 0.09 در گروه کنترل به 0.30 ± 0.05 در گروه تیمار شده کاهش یافت. در ادامه بررسی‌ها، سطح بیان *CASP9* نیز در سلول‌های تیمار شده افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.0014$). میزان بیان ژن *CASP9* در گروه تیمار شده 2.37 ± 0.28 بود، درحالی‌که این مقدار در گروه کنترل 1.00 ± 0.10 گزارش شد که افزایش معنی‌داری را نشان داد. نتایج این بخش در شکل ۳ ارائه شده است.

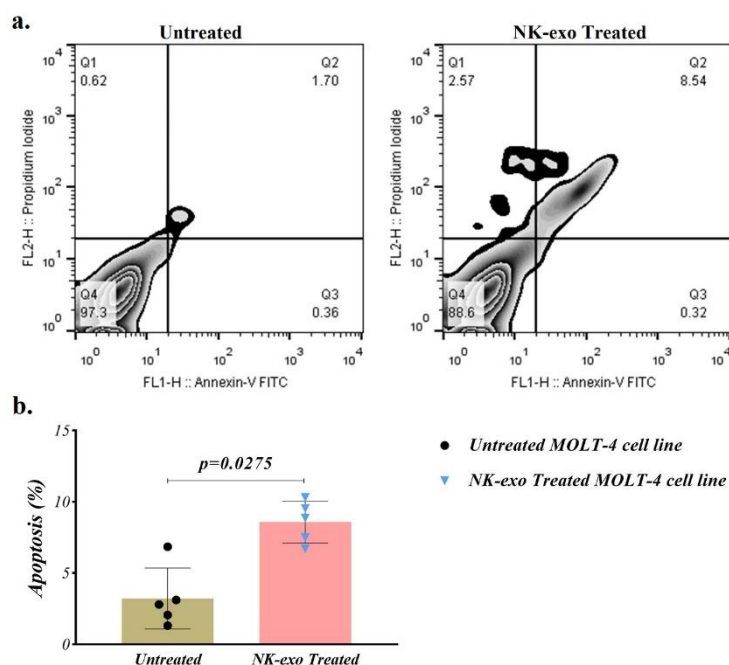


شکل ۳ - بررسی بیان ژن‌های مرتبط با مسیر میتوکندریایی آپوپتوز (BAX, Bcl-2 و Caspase-9) در سلول‌های MOLT-4 تیمار شده با اگزوزوم‌های NK که شامل کاهش معنی‌دار بیان BCL2 و افزایش معنی‌دار بیان BAX و Caspase-9 است و نشان‌دهنده افزایش فعالیت آپوپتوز در این سلول‌ها است. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردیده است

کنترل بود ($P < 0.001$). افزایش جمعیت سلول‌های Annexin V مثبت و Annexin V/PI مثبت در گروه تیمار شده نشان‌دهنده افزایش آپوپتوز سلولی در اثر تیمار با اگزوزوم‌های NK بود. نتایج این بخش در شکل ۴ ارائه شده است.

افزایش قابل توجه میزان آپوپتوز سلولی

نتایج حاصل از آنالیز Annexin V/PI flow cytometry نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوتیک شامل آپوپتوز اولیه و دیررس در گروه تیمار شده با اگزوزوم‌های NK به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه



شکل ۴ - بررسی میزان آپوپتوز سلولی با استفاده از آنالیز فلوسایتمتری Annexin V/PI در سلول‌های MOLT-4 تیمار شده با اگزوزوم‌های NK. (a) نمودارهای زیر فلوسایتمتری نماینده رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) در سلول‌های MOLT-4 تیمار نشده و تیمار شده با اگزوزوم پس از آنکوباسیون با اگزوزوم‌های مشتق شده از NK. سلول‌های موجود در چارک اول (Q1) نشان‌دهنده درصد سلول‌های نکرز شده، چارک دوم (Q2) نشان‌دهنده درصد سلول‌های دچار آپوپتوز دیر هنگام، چارک سوم (Q3) نشان‌دهنده درصد سلول‌های

دچار آپوپتوز اولیه و چارک چهارم (Q4) نشان دهنده سلول های زنده است. (b) تجزیه و تحلیل آماری افزایش قابل توجهی در آپوپتوز در سلول های تیمار شده با NK-exosome در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده نشان داد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردیده است.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اگزوزوم های مشتق از سلول های کشنده طبیعی (NK-derived exosomes) قادرند به طور قابل توجهی مرگ سلولی را در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد MOLT-4 القا کنند. افزایش بیان ژن های پروآپوپتوتیک *BAX* و *CASP9* همراه با کاهش بیان *Bcl-2* نشان می دهد که این اگزوزوم ها مسیر میتوکندریایی آپوپتوز را فعال می کنند. این یافته با مطالعات اخیر در زمینه ایمونوتراپی مبتنی بر NK-exosome همخوانی دارد. در مطالعه مروری جامع ژانگ (Zhang) و همکاران (۲۰۲۵) نشان داده شد که اگزوزوم های مشتق از سلول های NK دارای مولکول های سیتوتوکسیک نظیر پرفورین، گرانزیم و لیگاند های گیرنده مرگ هستند و می توانند از طریق فعال سازی مسیر های آپوپتوز وابسته به گیرنده مرگ یا مسیر میتوکندریایی، سلول های سرطانی را از بین ببرند [۱۰].

به طور مشابه، سی (Si) و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که NK-derived exosomes بسیاری از عملکردهای کشندگی سلول های NK را حفظ می کنند و علاوه بر آن، دارای مزایایی نظیر ایمنی بیشتر، قابلیت ذخیره سازی و حمل آسان و خطر کمتر بروز طوفان سایتوکاینی نسبت به سلول درمانی NK هستند [۱۱]. این ویژگی ها باعث شده است که اگزوزوم های NK به عنوان یک راهکار امیدوارکننده برای درمان سرطان مطرح شوند.

مطالعات تجربی نیز نشان داده اند که تقویت عملکرد این اگزوزوم ها می تواند اثرات ضدتوموری آنها را افزایش دهد. به عنوان مثال، چوی (Choi) و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که بارگذاری داروهای شیمی درمانی در اگزوزوم های NK می تواند اثرات ضدسرطانی آنها را به طور قابل توجهی افزایش دهد [۱۲]. علاوه بر این، هوانگ (Huang) و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که مهندسی ژنتیکی اگزوزوم های NK با افزایش بیان IL-24 و NKG2D باعث تقویت توانایی هدف گیری تومور و افزایش القای آپوپتوز در سلول های سرطانی می شود [۱۳].

در زمینه بدخیمی های خونی نیز نقش اگزوزوم ها به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. غفاری (Ghaffari) و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که اگزوزوم ها در بدخیمی های هماتولوژیک نه تنها در ارتباطات بین سلولی نقش دارند، بلکه می توانند به عنوان ابزارهای درمانی جدید مورد استفاده قرار گیرند [۱۴]. همچنین، ژانگ (Zhang) و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که اگزوزوم ها می توانند در تنظیم رشد تومور، مقاومت دارویی و تعاملات ریزمحیط تومور در سرطان های خونی نقش داشته باشند [۱۵].

از دیدگاه ایمونوتراپی، استفاده از وزیکول های خارج سلولی مشتق از NK به دلیل توانایی طبیعی این سلول ها در شناسایی و حذف سلول های بدخیم اهمیت ویژه ای دارد. کیزیلپینار (Kizilpinar) و دستوری (Dastouri) (۲۰۲۵) نشان دادند که NK-derived extracellular vesicles قادرند سلول های سرطانی را به طور انتخابی هدف قرار دهند و در عین حال به سلول های طبیعی آسیب نرسانند [۱۶]. علاوه بر این، ژانگ (Zhang) و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که

مهندسی وزیکول های خارج سلولی مشتق از NK می تواند کارایی درمانی آنها را افزایش دهد و امکان استفاده از آنها به عنوان سیستم های انتقال دارو را فراهم سازد [۱۷].

یکی از یافته های مهم مطالعه حاضر، مهار مسیر اتوفژی در سلول های لوسمیک بود. کاهش بیان ژن های *ATG5*، *BECN1* و *LC3B* نشان داد که اگزوزوم های NK می توانند مسیرهای بقای سلولی وابسته به اتوفژی را مهار کنند. مطالعات اخیر نشان داده اند که اتوفژی نقش دوگانه ای در سرطان دارد؛ از یک سو، می تواند موجب مرگ سلولی شود و از سوی دیگر، در بسیاری از تومورها به عنوان مکانیسم بقای سلولی عمل می کند. کوبوتو (Kubota) و کیمورا (Kimura) (۲۰۲۴) گزارش کردند که اتوفژی در بسیاری از لوسمی ها با مقاومت دارویی و بقای سلول های سرطانی مرتبط است [۱۸].

همچنین سئو (Seo) و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که مهار اتوفژی می تواند حساسیت سلول های لوسمیک را نسبت به درمان های ضدسرطان افزایش دهد [۱۹]. در همین راستا، فقیری (Faghiri) و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که miRNAهای مرتبط با اتوفژی می توانند مسیرهای بقا و مرگ سلولی را در لوسمی تنظیم کنند [۲۰]. در سطح مولکولی، پروتئین های کلیدی اتوفژی نقش مهمی در تنظیم بقای سلول های سرطانی دارند. کائو (Cao) و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که Beclin-1 در تقاطع مسیرهای اتوفژی و سرطان قرار دارد و تغییر بیان آن می تواند رشد تومور را تحت تأثیر قرار دهد [۲۱]. همچنین، لی (Li) و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که پروتئین های مرتبط با اتوفژی در پیشرفت لوسمی نقش مهمی دارند [۲۲].

از سوی دیگر، چن (Chen) و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که *LC3B* یکی از مارک های اصلی اتوفژی است و افزایش یا کاهش بیان آن می تواند بیانگر فعال یا مهارشدن مسیر اتوفژی در سلول های سرطانی باشد [۲۳]. علاوه بر این، لی (Li) و همکاران (۲۰۲۵) گزارش کردند که اتوفژی وابسته به *ATG5* می تواند باعث مقاومت دارویی در لوسمی شود [۲۴]. بنابراین، مهار این ژن ها در مطالعه حاضر می تواند توضیح دهنده افزایش آپوپتوز در سلول های MOLT-4 باشد.

تعامل بین آپوپتوز و اتوفژی نیز در درمان سرطان اهمیت زیادی دارد. لای (Leigh) و ری (Ray) (۲۰۲۶) نشان دادند که بسیاری از درمان های ضدسرطان از طریق القای هم زمان آپوپتوز و مهار اتوفژی اثرات ضدتوموری خود را اعمال می کنند [۲۵].

در زمینه استفاده از اگزوزوم ها در درمان لوسمی، انصاریان (Ansarian) و همکاران (۲۰۲۵) گزارش کردند که اگزوزوم ها می توانند به عنوان سیستم های انتقال مولکول های ضدسرطان در درمان بدخیمی های خونی مورد استفاده قرار گیرند [۲۶].

از سوی دیگر، تعامل اگزوزوم ها با سیستم ایمنی نیز اهمیت زیادی دارد. کلبورن (Coleborn) و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که وزیکول های خارج سلولی مشتق از سلول های سرطانی می توانند عملکرد سلول های NK را مهار کنند و از این طریق به فرار تومور از سیستم ایمنی کمک نمایند [۲۷]. در مقابل، اگزوزوم های مشتق از NK

مولکول‌های فعال زیستی، قابلیت مهندسی برای حمل داروها و سمیت کمتر نسبت به بسیاری از درمان‌های شیمیایی، آگزوزوم‌های NK می‌توانند به‌عنوان یک راهبرد امیدوارکننده در توسعه درمان‌های نوین برای لوسمی مطرح شوند. باین‌حال، برای انتقال این یافته‌ها به کاربردهای بالینی، انجام مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی ضروری است تا کارآیی، ایمنی و دوز مناسب این وزیکول‌ها در بیماران مبتلا به لوسمی به‌طور دقیق مشخص شود. همچنین، بررسی ترکیب این رویکرد با سایر روش‌های درمانی مانند شیمی‌درمانی هدفمند، CAR-T cell therapy یا مهارکننده‌های نقاط واریسی ایمنی می‌تواند مسیرهای جدیدی برای افزایش اثربخشی درمان و کاهش مقاومت دارویی در بیماران فراهم سازد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش قسمتی از پایان‌نامه آقای قاسم آقازاده بالکانلو در رشته پزشکی مقطع دکتری عمومی است و در مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است (شماره گرنت: ۷۲۹۴۸).

ملاحظات اخلاقی

این طرح تحقیقاتی در جلسه منطقه‌ای کمیته اخلاق با کد IR.TBZMED.REC.1404.134 در تاریخ ۱۴۰۴/۰۲/۰۸ مطرح و مورد تأیید قرار گرفت. این مطالعه بر روی افراد سالم داوطلب انجام شد و هیچ‌گونه بیمار در آن وارد نشده است. پیش از جمع‌آوری نمونه‌ها، رضایت‌نامه آگاهانه از تمامی شرکت‌کنندگان اخذ شد و در تمامی موارد مورد مطالعه اصل رازداری و امانت در مورد نام و اطلاعات شخصی افراد رعایت شد. تمامی مراحل پژوهش مطابق با اصول ایمنی زیستی و استانداردهای آزمایشگاهی انجام گردید. همه مراحل مطالعه مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی پژوهش‌های زیستی و انسانی انجام پذیرفت.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافع در این مقاله وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است (شماره گرنت: ۷۲۹۴۸).

References

1. Prema V, Karunika S, Xavier YA. An overview of acute lymphoblastic leukemia. Asian J Pharm Res. 2025;15(2):202–208. [Link]
2. Karimi S, Shahri M. Medical and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles using Achillea millefolium extract on MOLT-4 lymphoblastic leukemia cell line. J Med Virol. 2020;93(6):3899–3906. [DOI: 10.1002/jmv.26694] [PMID: 33236797]
3. Jiménez-Morales S, Aranda-Urbe IS, Pérez-Amado CJ, Ramírez-Bello J, Hidalgo-Miranda A. Mechanisms of

قادرند پاسخ‌های ایمنی ضدتوموری را تقویت کنند. همچنین، نشان داده شده است که ریزمحیط تومور می‌تواند عملکرد سلول‌های NK را تغییر دهد و در نتیجه نقش مهمی در پیشرفت سرطان ایفا کند [۲۸].

در نهایت، کاکارلا (Kakarla) و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که وزیکول‌های خارج سلولی در انتقال سیگنال‌های ایمنی و تنظیم تعاملات بین سلولی در سرطان نقش مهمی دارند [۲۹].

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های NK می‌توانند از طریق فعال‌سازی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و مهار مسیرهای اتوفاژی اثرات ضدتوموری قابل توجهی در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد ایجاد کنند. این یافته‌ها با ادبیات علمی اخیر در زمینه ایمونوتراپی مبتنی بر NK-exosome همخوانی دارد و نشان می‌دهد که این وزیکول‌ها می‌توانند به‌عنوان ابزارهای نوین در درمان سرطان‌های خونی مورد استفاده قرار گیرند.

باوجود نتایج امیدوارکننده حاصل از این پژوهش، مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی بود که باید در تفسیر نتایج مورد توجه قرار گیرد. نخست آنکه این مطالعه تنها در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و بر روی رده سلولی MOLT-4 انجام شد؛ بنابراین تعمیم مستقیم یافته‌ها به شرایط بالینی نیازمند انجام مطالعات حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی است. همچنین، بررسی حاضر صرفاً بر ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی و آپوپتوز متمرکز بود و تغییرات در سطح پروتئین‌ها یا مسیرهای سیگنالینگ پایین‌دستی مورد بررسی قرار نگرفت. ازسوی دیگر، محتوای مولکولی آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های NK شامل miRNAها، پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های تنظیمی به‌صورت اختصاصی آنالیز نشد و مکانیسم دقیق اثرات ضدسرطانی این آگزوزوم‌ها همچنان نیازمند بررسی بیشتر است. علاوه‌براین، استفاده از یک رده سلولی منفرد می‌تواند از دیگر محدودیت‌های مطالعه محسوب شود و پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، اثر آگزوزوم‌های NK بر سایر رده‌های سلولی لوسمی و همچنین نمونه‌های اولیه بیماران نیز ارزیابی گردد.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان *BAX* و *CASP9*، کاهش بیان *Bcl-2* و کاهش بیان ژن‌های کلیدی اتوفاژی شامل *ATG5*، *BECN1* و *LC3B* نشان‌دهنده آن است که این آگزوزوم‌ها با تنظیم هم‌زمان مسیرهای مرگ و بقا در سلول‌های لوسمیک، اثرات ضدسرطانی قابل توجهی ایجاد می‌کنند. با توجه به مزایایی مانند زیست‌سازگاری بالا، توانایی انتقال

- immunosuppressive tumor evasion: focus on acute lymphoblastic leukemia. Front Immunol. 2021;12:737340. [DOI: 10.3389/fimmu.2021.737340] [PMID: 34867958]
4. Hu W, Wang G, Huang D, Sui M, Xu Y. Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities. Front Immunol. 2019;10:1205. [DOI: 10.3389/fimmu.2019.01205] [PMID: 31214177]
5. Valenzuela-Vázquez L, Núñez-Enríquez JC, Sánchez-Herrera J, Medina-Sanson A, Pérez-Saldivar ML, Jiménez-Hernández E, et al. NK cells with decreased expression of

- multiple activating receptors is a dominant phenotype in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol.* 2022;12:1023510. [DOI: 10.3389/fonc.2022.1023510] [PMID: 36419901]
6. Hatami Z, Hashemi ZS, Eftekhary M, Amiri A, Karpishev V, Nasrollahi K, et al. Natural killer cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: innovative therapeutics art. *Cancer Cell Int.* 2023;23(1):157. [DOI: 10.1186/s12935-023-02996-6] [PMID: 37543612]
 7. Ebrahimi F, Kumari A, Ghadami S, Al Abdullah S, Dellinger K. The potential for extracellular vesicles in nanomedicine: a review of recent advancements and challenges ahead. *Adv Biol.* 2025;9(8):2400623. [DOI: 10.1002/adbi.202400623] [PMID: 39739455]
 8. Boyiadzis M, Hong CS, Whiteside TL. Anti-leukemia effects of NK cell-derived exosomes. *Blood.* 2019;134:3223. [Link]
 9. Huang FL, Yu SJ, Li CL. Role of autophagy and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Control.* 2021;28:10732748211019138. [DOI: 10.1177/10732748211019138] [PMID: 34169775]
 10. Zhang A, Yin X, Ma J. NK-derived exosomes in anti-tumor strategies. *Med Oncol.* 2025;42(9):418. [DOI: 10.1007/s12032-025-02965-1] [PMID: 40782186]
 11. Si C, Gao J, Ma X. Natural killer cell-derived exosome-based cancer therapy: from biological roles to clinical significance and implications. *Mol Cancer.* 2024;23(1):134. [DOI: 10.1186/s12943-024-02045-4] [PMID: 38951879]
 12. Choi YH, Kim HY, Park JO, Choi E. Enhanced anti-tumor effects of natural killer cell-derived exosomes through doxorubicin delivery to hepatocellular carcinoma cells: cytotoxicity and apoptosis study. *Int J Mol Sci.* 2025;26(5):2234. [DOI: 10.3390/ijms26052234] [PMID: 40076856]
 13. Huang C, Hu Q, Wang P, Xie M, Zhang Y, Li Z, et al. Overexpression of NKG2D and IL24 in NK cell-derived exosomes for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2025;26(5):2098. [DOI: 10.3390/ijms26052098] [PMID: 40076725]
 14. Ghaffari K, Moradi-Hasanabad A, Sobhani-Nasab A, Javaheri J, Ghasemi A. Application of cell-derived exosomes in the hematological malignancies therapy. *Front Pharmacol.* 2023;14:1263834. [DOI: 10.3389/fphar.2023.1263834] [PMID: 37745073]
 15. Zhang H, Xia J, Wang X, Wang Y, Chen J, He L, et al. Recent progress of exosomes in hematological malignancies: pathogenesis, diagnosis, and therapeutic strategies. *Int J Nanomedicine.* 2024;19:11611–11631. [DOI: 10.2147/IJN.S479697] [PMID: 39539968]
 16. Kizilpinar M, Dastouri M. Therapeutic effects of NK cell-derived EVs on cancer: current advances and future treatment strategies. *Biomed Adv.* 2025;2(1):10–24. [Link]
 17. Zhang W, Zhang X, Zhou Z, Lu X, Cheng T, Zhang X, et al. Engineering natural killer cell-derived extracellular vesicles for disease therapy. *J Control Release.* 2026;390:114535. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2025.114535] [PMID: 41389966]
 18. Kubota Y, Kimura S. Current understanding of the role of autophagy in the treatment of myeloid leukemia. *Int J Mol Sci.* 2024;25(22):12219. [DOI: 10.3390/ijms252212219] [PMID: 39596291]
 19. Seo W, Silwal P, Song IC, Jo E. The dual role of autophagy in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):51. [DOI: 10.1186/s13045-022-01262-y] [PMID: 35526025]
 20. Faghiri Beyrami A, Movasaghpour Akbari AA, Aghebati-Maleki L, Dolati S, Yousefi M. The crosstalk between MiRNAs and autophagy in leukemia: mechanisms and therapeutic insights. *Discov Oncol.* 2025;16(1):1917. [DOI: 10.1007/s12672-025-03686-7] [PMID: 41105361]
 21. Cao Z, Tian K, Ran Y, Zhou H, Zhou L, Ding Y, et al. Beclin-1: a therapeutic target at the intersection of autophagy, immunotherapy, and cancer treatment. *Front Immunol.* 2024;15:1506426. [DOI: 10.3389/fimmu.2024.1506426] [PMID: 39650649]
 22. Li M, Li J, Zhang S, Zhou L, Zhu Y, Li S, et al. Progress in the study of autophagy-related proteins affecting resistance to chemotherapeutic drugs in leukemia. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1394140. [DOI: 10.3389/fcell.2024.1394140] [PMID: 38887520]
 23. Chen Y, Yi H, Liao S, He J, Zhou Y, Lei Y. LC3B: a microtubule-associated protein influences disease progression and prognosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2025;81:16–26. [DOI: 10.1016/j.cytogfr.2024.11.006] [PMID: 39701849]
 24. Li X, Qian Q, Li J, Zhang L, Wang L, Huang D, et al. The RNA-binding protein CELF1 targets ATG5 to regulate autophagy and promote drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis.* 2025;16(1):599. [DOI: 10.1038/s41419-025-07926-0] [PMID: 40781108]
 25. Leigh K, Ray SK. Exosomes as specific vehicles for delivery of combination therapies for inhibiting autophagy and inducing apoptosis in MYCN-amplified neuroblastoma displaying gut dysbiosis: current challenges and future opportunities. *Brain Sci.* 2026;16(2):125. [DOI: 10.3390/brainsci16020125] [PMID: 41750126]
 26. Ansarian MA, Fatahichegeni M, Wang Y, Ren J, Wang X. Harnessing the power of exosomes in leukemia: from molecular messengers to clinical applications. *Discov Oncol.* 2025;16(1):1997. [DOI: 10.1007/s12672-025-03814-3] [PMID: 41171532]
 27. Coleborn E, Ghebosu R, Wolfram J, Souza-Fonseca-Guimaraes F. Cancer-derived extracellular vesicles in natural killer cell immune evasion: molecular mechanisms and therapeutic insights. *Mol Ther.* 2025;33(9):4113–4129. [DOI: 10.1016/j.ymthe.2025.05.038] [PMID: 40452185]
 28. Zhu L, Kalimuthu S, Gangadaran P, Oh JM, Lee HW, Baek SH, et al. Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Theranostics.* 2017;7(10):2732–2745. [DOI: 10.7150/thno.18752] [PMID: 28819459]
 29. Kakarla R, Hur J, Kim YJ, Kim J, Chwae YJ. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Exp Mol Med.* 2020;52(1):1–6. [DOI: 10.1038/s12276-019-0362-8] [PMID: 31915368]