

Araştırma Makalesi | Research Article

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HASTALARINDA NOTCH EKSPRESYON SEVİYELERİ: AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

NOTCH EXPRESSION LEVEL IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS: EVALUATION BY FLOW CYTOMETRY

 Fatma Betül Öktemlik^{1,2},  Murat Özbalak³,  İpek Yönel Hindilerden³,  Günnur Deniz²,  Metin Yusuf Gelmez²

¹İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye. ²İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. ³İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye.



ÖZ

Amaç: CD5⁺CD19⁺ malign B hücrelerin kemik iliği ve kanda birikmesi ile karakterize kronik lenfositik lösemi (KLL), Amerika ve Avrupa'da yetişkinlerde en sık gözlenen lösemi tipidir. CD38, ZAP70 ekspresyonları, immüoglobülin ağır zincir değişken bölge (IgVH) mutasyonları hastalığın klinik seyri hakkında bilgi sağlasa da KLL patogenezi henüz net olarak tanımlanmamıştır. Transmembran proteini olan Notch reseptörleri hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozis süreçlerinde immün homeostazın sağlanmasında oldukça önemlidir. Güncel çalışmalar, Notch moleküllerinin kanser gelişiminde rolü olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada KLL tanısı almış hastalarda Notch seviyeleri analiz edilerek KLL patogenezindeki rolleri incelenmiştir.

Yöntem: KLL tanılı 15 hasta ve 9 sağlıklı bireyin periferik kanından izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerde akan hücre ölçer ile Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 seviyeleri değerlendirildi.

Bulgular: KLL hastalarında lenfosit, CD19⁺ B ve CD3⁺ T hücrelerde Notch1 ifadesinin arttığı, buna karşın Notch4 ifadesinin ise azaldığı gözlemlendi. Hasta ve sağlıklı bireyler arasında Notch2 ve Notch3 ifadeleri arasında anlamlı fark gözlenmedi.

Sonuç: KLL hastalarında yüksek *Notch1* mRNA ifadesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu, Notch4 aktivasyonunun ise kemoterapiye direnç oluşturduğu bildirilmektedir. Bulgularımız akan hücre ölçer ile Notch ifadelerinin hastalarda hızlı bir şekilde değerlendirilebileceğini ve değişen Notch1 ve Notch4 ifadelerinin KLL patogenezinde potansiyel belirteçler olarak öne çıkabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik lenfositik lösemi, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4

ABSTRACT

Objective: Chronic lymphocytic leukemia (CLL), characterized by the accumulation of CD5⁺CD19⁺ malignant B cells in the bone marrow and blood, is the most common type of leukemia in adults in the United States and Europe. While CD38 and ZAP70 expression and immunoglobulin heavy chain variable region (IgVH) mutations provide insights into the clinical outcome of the disease, the pathogenesis of CLL has not yet been fully elucidated. Notch receptors, which are transmembrane proteins, play a critical role in regulating cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Recent studies have demonstrated the involvement of Notch proteins in various types of cancer. In this study, the levels of Notch molecules were analyzed in CLL patients to investigate their roles in the pathogenesis of the disease.

Methods: Notch-1, Notch2, Notch3, and Notch4 levels were analyzed by flow cytometry in peripheral blood mononuclear cells isolated from heparinized blood samples of 15 CLL patients and 9 healthy individuals.

Results: Compared to healthy individuals, increased Notch1 and decreased Notch4 levels were found in total lymphocytes, B cells, and T lymphocytes in CLL patients. No significant differences were detected in Notch2 and Notch3 expression between patients and healthy individuals.

Conclusion: It has been reported that high Notch1 mRNA expression is associated with poor prognosis and Notch4 activation contributes to chemotherapy resistance in CLL patients. Our findings demonstrate that Notch expression can be rapidly analyzed in CLL patients using flow cytometry. Additionally, our findings suggest that Notch1 and Notch4 expression can be used as potential biomarkers in CLL pathogenesis.

Key words: Chronic lymphocytic leukemia, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4

Giriş

Batı ölkelerinde yetişkinlerde en sık gözlenen lösemi türü olan kronik lenfositik lösemi (KLL), çoğalma kapasitesi düşük, CD5 ifade eden malign B hücrelerin kanda, lenf nodunda, kemik iliğinde birikimiyle tanımlanır.¹ Malign B hücreleri CD5, CD19 ve CD23 ifade ederken, CD79b ve FMC7 ifade etmezler.² Diğer lösemilerden farklı olarak KLL patogeneğinde *BCL-2* ve *p53* genlerinde mutasyon, immünoglobülin ağır zincir değişken bölge (IgVH) mutasyonları, trizomi 12, 11q, 13q ve 17p delesyonları gibi genetik faktörler, CD38 ve ZAP70 ekspresyon seviyeleri hastalığın klinik gidişatını gösteren önemli belirteçlerdir.³ Hastaların önemli bir kısmında hastalık yavaş seyirlidir, tedaviye ihtiyaç duyulmamaktadır. Buna karşın hastaların bir kısmında tanı anında ya da sonrasında tedavi uygulanmaktadır.⁴

Epidermal büyüme faktörü benzeri tekrar dizileri içeren bir transmembran proteini olan Notch reseptörü ve ligandları, hücreler arası farklılaşma, apoptoz, organ gelişimi, doku homeostazının düzenlenmesi ve kök hücrelerin kendini yenilemesi gibi normal biyolojik süreçleri düzenleyen, evrim boyunca yüksek derecede korunmuş moleküllerdir.⁵ Notch sinyal transdüksiyonunu başlatmak için genellikle reseptör-ligand etkileşimi gerekmektedir.⁶ Güncel çalışmalar Notch sinyal yolunun birçok kanser türünde onkogenik ya da tümör baskılayıcı bir faktör olarak rol alabileceğini bildirmektedir.⁷ Ayrıca, Notch sinyal yolunun, tümör hücrelerine kemorezistans kazandırılmasında rol oynadığı bilinmektedir.⁷ Bu özellikleri Notch sinyalini hedef alan yeni tedavi uygulamalarının geliştirilmesine ışık tutmaktadır.⁸

Notch reseptör mutasyonlarının T ve B hücrelerinde fonksiyonel bozukluklara neden olabileceği ve hematolojik malignitelerdeki rolleri farklı çalışmalar ile ortaya konulmaktadır.⁹ T hücre gelişiminde önemli rolü olan Notch1'in T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) patogeneindeki rolü t(7;9) keşfiyle ortaya çıkmıştır.⁹ Marjinal zone farklılaşması ve gelişiminde Notch2'in rolü olduğu bilinmektedir.^{10,11} Güncel veriler, *Notch2* genindeki mutasyonların marjinal zone lenfoması (MZL) gelişimine neden olduğunu ve hastalığın patogeneindeki kritik rolünü vurgulamaktadır.¹² KLL patogeneğinde Notch1 ve Notch2 ligandları olan Jag1 ve Jag2'in sürekli olarak ifade edildiği ve bu moleküllerin apoptoza karşı malign B hücrelerine direnç kazandırdığı ifade edilmektedir.^{9,13} Bu nedenle, farklı Notch sinyal yollarının hematolojik kanserler için potansiyel terapötik hedefler olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir.⁶ Notch reseptörlerinin tümörler ve kanser üzerindeki rolleri iyi bilinmekte olup, viral enfeksiyonlardaki etkileri de ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmuştur. Özellikle, Covid-19 enfeksiyonunu ağır geçiren hastalarda Notch4 reseptörünün, düzenleyici T hücrelerinde (Treg) ekspresyon seviyelerinin arttığı bilinmektedir.¹⁴ Ayrıca, Notch1 reseptörünün multisistem enflamatuvar sendrom (MIS-C) hastalarında Treg hücreleri tarafından yüksek seviyelerde ifade edildiği ve bu hücrelerin destabilizasyonuna yol açtığı gösterilmiştir.¹⁵ Tüm bu veriler, Notch sinyal yolunun önemli rolleri nedeniyle, bu

yolu hedef alan yeni tedavi yaklaşımlarının veya biyobelirteçlerin geliştirilmesinin hastalık patogeneğinde önemli yer tuttuğunu göstermektedir.

Bu çalışmada KLL tanısı almış hastalarda Notch seviyeleri akan hücre ölçer ile analiz edilerek KLL patogeneindeki rolleri incelenmiştir.

Yöntem

Hasta Grubu

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Hematoloji polikliniğinde takibi yapılan ve herhangi bir ilaç tedavisi almayan, $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ üzerinde lenfosit ve periferik kanında olgun görünümülü ve CD5 ifade eden CD19 hücresi olan olan; enfeksiyonu ya da sekonder bir kronik rahatsızlığı olmayan 15 (8 erkek, 7 kadın) KLL hastası çalışmaya dahil edildi. Cinsiyet ve yaş uyumlu, 9 (6 erkek, 3 kadın) sağlıklı erişkin ile kontrol grubu oluşturuldu. Sağlıklı erişkinlerin seçiminde otoimmünite ve kanser öyküsü olmaması, örnek alındığında enfeksiyon gözlenmemesine dikkat edildi. Çalışmaya katılan tüm gönüllülerden bilgilendirilmiş gönüllü onam formları alındı (İ.Ü. İTF Etik Kurulu, no:1301, tarih:13.11.2017).

Akan Hücre Ölçer Sistemi ile Notch Analizi

Olgulardan alınan periferik kan (10ml) örneklerinde ficoll yöntemi ile periferik kan mononükleer hücreler izole edildi. Hücreler (5×10^6 hücre/ml) üzerine anti-Notch1 FITC, -Notch4 PE, -CD5 PE-CY5, -CD19 APC, -CD3 AlexaFluor700, -Notch3 BV421 ve -Notch2 BV650 monoklonal antikorları eklendi. Kullanılan tüm monoklonal antikorlar BioLegend (ABD) firmasından temin edildi. Hücreler 20 dakika inkübasyon sonrasında fosfat tuzlu tamponu (PBS) ile 1800 rpm'de 10 dakika yıkanarak hücre pelleti üzerine PBS eklendi ve örnekler Novocyt (Agilent, ABD) akan hücre ölçer cihazından geçirilerek NovoExpress analiz programında değerlendirildi. Tüm örneklerde SSC/FSC grafiğinde lenfosit kapısında en az 200.000 hücre sayıldı. Lenfosit, CD19⁺ B, CD3⁺ T lenfosit popülasyonları içinde Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 seviyeleri analiz edildi.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 9.1 uygulamasından yararlanıldı. Gruplar arası karşılaştırma analizleri için veriler normalizasyon testine tabi tutuldu. Normal dağılım göstermeyen gruplara Mann-Whitney-U Testi uygulandı. Spearman Testi ile korelasyon analizleri gerçekleştirildi. Verilerin istatistiksel anlamlılık değerleri, $p \leq 0,05$ olarak kabul edildi.

Bulgular

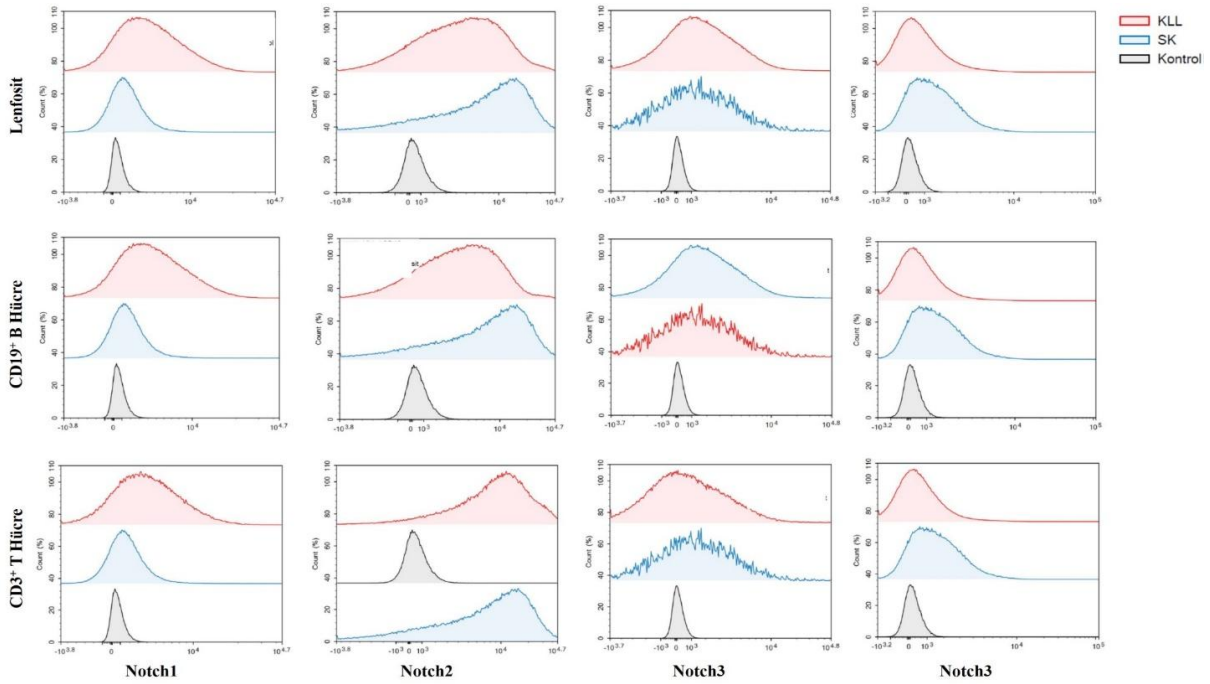
Çalışmada yer alan 8 erkek, 7 kadın olmak üzere toplam 15 KLL hastasının yaş ortalaması 68 (59-77) yıldır. Kadın hastaların yaş ortalaması 67 (59-73), erkek hastaların ise 71 (66-77) yıldır. Binet evreleme sistemine göre 5 hasta evre A, 10 hasta ise evre B, Rai sınıflandırmasına göre ise 4 hasta evre 0, 2 hasta evre I, 4 hasta evre II ve 5 hasta ise evre III olarak değerlendirildi. Hastaların klinik ve demografik verileri Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. KLL hastalarına ait klinik ve demografik özellikleri

n		KLL 15	Sağlıklı Kontrol 9
Cinsiyet	Erkek (n)	8	6
	Kadın (n)	7	3
Yaş Ortalaması (Yıl) (En düşük-En yüksek)		68 (59 - 77)	54 (49 - 60)
WBC ($10^9/L$) (ortalama) (En düşük-En yüksek)		47.19 (7.7 - 176)	-
LYM ($10^9/L$) (ortalama) (En düşük-En yüksek)		38.03 (6.3 - 159)	-
Kromozomal Anomali	del11q (n)	0	-
	del13q (n)	0	-
	del17p (n)	0	-
	tri12 (n)	0	-
CD38	Pozitif (n)	4	-
	Negatif (n)	11	-
BINET Evre	A (n)	5	-
	B (n)	10	-
	C (n)	0	-
	O (n)	4	-
	I (n)	2	-
Rai Evre	II (n)	4	-
	III (n)	5	-
	IV (n)	-	-
Tedavi	Yok (n)	15	-
	Var (n)	0	-

Akan hücre ölçer ile Notch seviyeleri analiz edilirken önce SSC/FSC grafiğinde lenfositler kaplandı. Lenfositler içinde SSC/CD19 grafiğinde CD19⁺ B hücreler ve SSC/CD3

grafiğinde CD3⁺ T hücreler kaplandı. Total lenfosit, B lenfosit ve T lenfositler içinde Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 seviyeleri analiz edildi (Şekil 1).

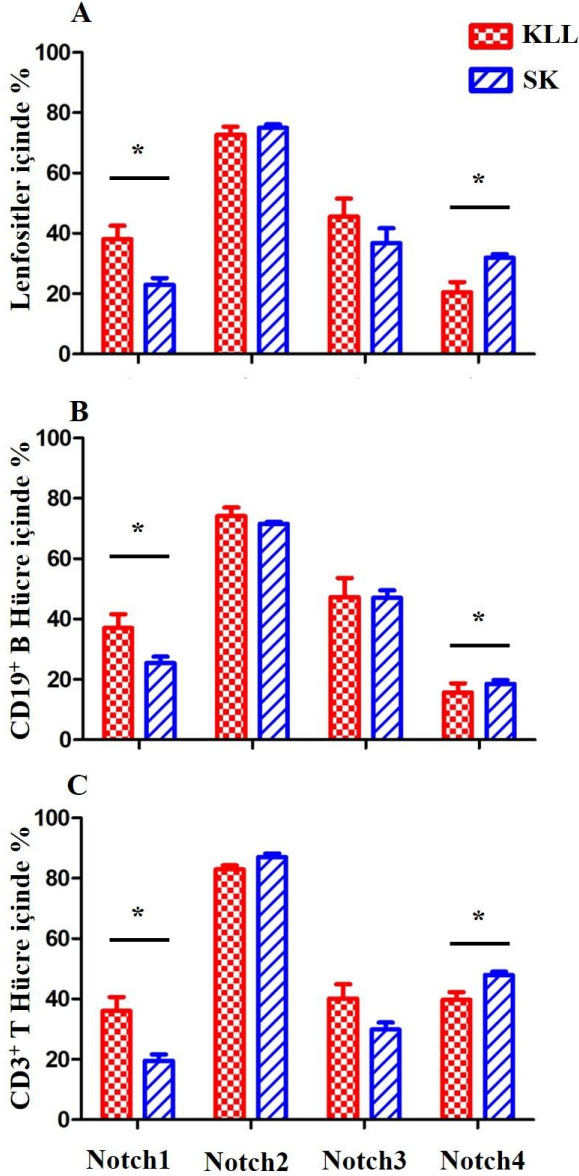


Şekil 1. KLL (kırmızı renk), sağlıklı kontrol - SK (mavi renk) ve izotip kontrole (gri renk) ait lenfosit, CD19⁺ B hücre ve CD3⁺ T hücrelerde Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 seviyelerini gösteren histogram görüntüleri.

Total lenfositler içinde değerlendirildiğinde Notch1seviyesinin KLL hastalarında sağlıklı bireylere göre arttığı, Notch4 seviyesinin ise azaldığı tespit edildi

(sırasıyla; p=0,03 ve p=0,02) (Şekil 2A). Hasta ve sağlıklı bireyler arasında lenfositlerde Notch2 ve Notch3 seviyeleri açısından ise anlamlı bir fark gözlenmedi. Notch seviyeleri

B ve T lenfositler içinde analiz edildiğinde sağlıklı bireylere kıyasla KLL hastalarında hem B hem de T lenfositlerde yüksek Notch1 seviyeleri gözlemlendi (sırasıyla; $p=0,05$ ve $p=0,03$). Buna karşın hastalarda Notch4 seviyelerinin ise B ve T lenfositlerde düşük olduğu saptandı (sırasıyla; $p=0,05$ ve $p=0,05$) (Şekil 2B-2C). B ve T lenfosit Notch2 ve Notch3 seviyeleri incelendiğinde hasta ve sağlıklı bireyler arasında fark olmadığı tespit edildi. Hastalarda Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 seviyeleri Rai ve Binet evreleme sistemleri ve CD38 durumuna göre analiz edildiğinde hasta grupları içinde fark gözlenmedi.



Şekil 2. Lenfosit, CD19⁺ B hücre ve CD3⁺ T hücrelerde Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 seviyelerinin KLL (kırmızı renk) ve sağlıklı kontrollerde (mavi renk) karşılaştırılması, * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Tartışma

Batı ülkelerinde sık gözlenen KLL yavaş seyirli bir hastalıktır. Hastaların çoğunluğu tedavi almadan sadece klinik olarak takip edilirken, hastaların bir kısmında tedavi uygulanır.²

KLL'yi diğer hematolojik hastalıklardan ayırıcı özelliklerinden biri akan hücre ölçer ile B hücrelerinde CD5 ve CD23 pozitifliği yanında, FMC7 ve CD79b ifadesinin negatif olarak gözlenmesidir.³ *IgVH* mutasyon durumu, CD38 ve ZAP70 düzeyi ile del17p, del13q gibi kromozomal değişikliklerin hastalığın klinik gidişi ile ilişkili oldukları bilinmektedir.¹⁶ KLL patogenezi henüz net olarak ortaya konulamamıştır ve hastalığın klinik gidişatını gösterebilecek parametrelerin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Hücre çoğalması, hücre farklılaşması, apoptoz gibi birçok hücresel süreçte rol alan Notch sinyal yolağının birçok kanserde de önemli role sahip olduğu gösterilmektedir.⁷ İlk olarak T-ALL'de t(7;9) translokasyonunun Notch1 transkriptlerini kısıtladığı ve hastalığın patogenezi için rol aldığı gösterilmiştir.¹⁷ Çalışmalar akciğer skuamöz hücreli karsinom, meme kanseri ve anaplastik büyük hücreli lenfoma gibi çeşitli kanserlerde onkojenik *Notch* gen mutasyonlarını ortaya koymaktadır.¹⁸⁻²⁰

Notch1 ve Notch2'nin KLL'li hastalarda sürekli olarak ifade edildiği ve malign B-KLL hücrelerini apoptoza dirençli kıldıkları bildirilmektedir.⁹ İlave olarak KLL hastaların yaklaşık %10'unda *Notch1* geninde somatik mutasyonun olduğu, refrakter hastalar ile Richter dönüşümü olan hastalarda *Notch1* mutasyon sıklığının daha yüksek olduğu bilinmektedir.²¹ Ayrıca güncel çalışmalar, *Notch* mutasyonu olan KLL'li hastalarda difüz büyük B hücreli lenfomaya transformasyon riskinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.²² Tüm veriler, Notch sinyal yolağının ve özellikle *Notch1* mutasyonunun, KLL'nin klinik gidişini gösterebilecek bir biyobelirteç olabileceği izlenimini vermektedir.²³ Bu veriler ile uyumlu olarak çalışmamızda KLL hastalarında Notch1 seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu artışın hem B hem de T lenfositlerde olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızın önemli kısıtlamalarından biri hastalarda *Notch1* gen mutasyonu bakılmamasıdır. Buna karşın güncel çalışmalar, *Notch1* mutasyonu saptanmayan KLL hastalarında da *Notch1* mRNA ekspresyonunun yükseldiğini ve mRNA ekspresyonu açısından mutasyonu olan hastalar ile aralarında fark olmadığını bildirmektedir.²¹

Notch4, ağırlıklı olarak kan damarlarında ve kemik iliğinde mezenkimal stromal hücrelerde eksprese olur. Ayrıca *Notch4* knock-out hayvan çalışmaları, bu hayvanlarda damar gelişimde belirgin değişiklikler gözlemlendiğini ifade etmektedir.²⁴ KLL hastalarında kemik iliği stromal hücrelerinde Notch4 uyarımının kemoterapiye direnç oluşmasına neden olduğu bildirilmektedir.⁹ Pre-klinik çalışmalar, B-ALL ve KLL'de, anti-Notch4 antikor uygulamasının, kemik iliği mezenkimal stromal hücreler ile tümör hücreleri arasındaki Notch4 sinyallemesini bloke ettiğini ve tümör hücrelerinin yaşam süresini kısalttığını göstermektedir.²⁵ Ayrıca, azalan Notch4 seviyesinin, Treg hücrelerinin baskılama kapasitesini artırarak tümör hücreleriyle mücadele eden T hücrelerinin inhibisyonuna ve tümör hücrelerinin lizisinin engellenmesine yol açabileceği öne sürülmektedir.¹⁴ Çalışmamızda KLL hastalarında Notch4 seviyesinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı gözlemlendi. Çalışmalar B-KLL hücrelerinin IL-10, TGF- β gibi sitokinler sekrete ettiğini ve immün yanıtları

baskılabileceğini göstermektedir.^{26,27} Bu özellikleri ile Treg hücrelere benzediği ifade edilmektedir.²⁷ Azalan Notch4 seviyesinin Treg fonksiyonlarını arttırıcı özelliği ve B-KLL hücrelerinin Treg'lere benzerliği dikkate alındığında, bulgularımız KLL hastalarında özellikle B hücrelerinde azalan Notch4 seviyesinin malign B hücrelerinde IL-10 gibi immün baskılayıcı sitokinlerin sekrete edilmesine neden olarak KLL'de gözlenen T hücre disfonksiyonuna neden olabileceğini düşündürmektedir. İlaven, Notch4 seviyesinin düşük olarak gözlenmesi çalışmaya dahil edilen hastaların hem erken evre olması hem de herhangi bir tedavi uygulanmayan hastalardan oluşmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Tedavi alan ve direnç gözlenen hastalarda yapılacak çalışmalar bu konuda daha ayrıntılı sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

Açıklamalar

Bu çalışmaya verdiği katkı için rahmetli Prof. Dr. Melih AKTAN'a teşekkür ederiz.

Etik Standartlara Uygunluk

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmıştır (No:1301, tarih:13.11.2017/25). Tüm prosedürler, kurumsal ve/veya ulusal araştırma komitesinin etik standartlarına ve Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: TDP-2019-32394) tarafından desteklenmiştir.

Yazar Katkısı

FBO, GD, MYG: Çalışmanın tasarımı, veri toplanması ve analizi, kaynak taraması ve makale yazımı; MO, İYH: Çalışmanın tasarımı, veri toplanması ve makale yazımı

Kaynaklar

1. Kikushige Y. Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *J Clin Exp Hematop.* Dec 15 2020;60(4):146-158. doi:10.3960/jslrc.20036
2. Braish J, Cerchione C, Ferrajoli A. An overview of prognostic markers in patients with CLL. *Front Oncol.* 2024;14:1371057. doi:10.3389/fonc.2024.1371057
3. Koehrer S, Burger JA. Chronic Lymphocytic Leukemia: Disease Biology. *Acta Haematol.* 2024;147(1):8-21. doi:10.1159/000533610
4. Brown JR. Clinical Risks for Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Compr Canc Netw.* Apr 2024;22(3)doi:10.6004/jnccn.2024.7020
5. Sachan N, Sharma V, Mutsuddi M, Mukherjee A. Notch signalling: multifaceted role in development and disease. *FEBS J.* Jul 2024;291(14):3030-3059. doi:10.1111/febs.16815

Sonuç olarak, özellikle artan Notch1 seviyesinin hematoloji laboratuvarlarında kullanımı her geçen gün artan akan hücre ölçe ile tespit etmek daha ucuz maliyet ile hızlı bir şekilde sonuç alınmasını sağlayabilir. Güncel çalışmalar Notch1 hedefleyen monoklonal antikor uygulaması gibi tedavi stratejilerinin agresif seyreden KLL hastaları için bir seçenek olabileceğini göstermektedir.²⁸ Çalışmamıza dahil edilen herhangi bir ilaç tedavisi almayan hastaların uzun dönem takipleri yapılarak Notch1 seviyesi ile ilaç tedavisi başlanması arasındaki ilişkinin ortaya konulması Notch1'in klinik bir gösterge olarak kullanılabilirliğinin test edilmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca ileri çalışmalarda tedavi alan KLL hastalarında Notch1 seviyelerinin tedavi almayan hastalar ile karşılaştırılması da klinik gidiş ile Notch1 düzeyi arasındaki ilişkinin gösterilmesine katkı sunabilir.

6. Cai J, Qiao Y, Chen L, Lu Y, Zheng D. Regulation of the Notch signaling pathway by natural products for cancer therapy. *J Nutr Biochem.* Jan 2024;123:109483. doi:10.1016/j.jnutbio.2023.109483
7. Shi Q, Xue C, Zeng Y, et al. Notch signaling pathway in cancer: from mechanistic insights to targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther.* May 27 2024;9(1):128. doi:10.1038/s41392-024-01828-x
8. Feng M, Santhanam RK, Xing H, Zhou M, Jia H. Inhibition of gamma-secretase/Notch pathway as a potential therapy for reversing cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol.* Feb 2024;220:115991. doi:10.1016/j.bcp.2023.115991
9. Gagnani L, Lorini S, Marri S, Zignego AL. Role of Notch Receptors in Hematologic Malignancies. *Cells.* Dec 24 2020;10(1)doi:10.3390/cells10010016
10. Meurette O, Mehlen P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* Oct 8 2018;34(4):536-548. doi:10.1016/j.ccell.2018.07.009
11. Saito T, Chiba S, Ichikawa M, et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity.* May 2003;18(5):675-85. doi:10.1016/s1074-7613(03)00111-0
12. Alderuccio JP, Lossos IS. NOTCH signaling in the pathogenesis of splenic marginal zone lymphoma-opportunities for therapy. *Leuk Lymphoma.* Feb 2022;63(2):279-290. doi:10.1080/10428194.2021.1984452
13. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood.* Jan 22 2009;113(4):856-65. doi:10.1182/blood-2008-02-139725
14. Harb H, Benamar M, Lai PS, et al. Notch4 signaling limits regulatory T-cell-mediated tissue repair and promotes severe lung inflammation in viral infections. *Immunity.* Jun 8 2021;54(6):1186-1199 e7. doi:10.1016/j.immuni.2021.04.002
15. Benamar M, Chen Q, Chou J, et al. The Notch1/CD22 signaling axis disrupts Treg function in SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children. *J Clin Invest.* Jan 3 2023;133(1)doi:10.1172/JCI163235
16. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol.* Dec 1 2021;96(12):1679-1705. doi:10.1002/ajh.26367
17. Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:353-61. doi:10.1182/asheducation-2009.1.353
18. Kontomanolis EN, Kalagasidou S, Pouliliou S, et al. The Notch Pathway in Breast Cancer Progression.

- ScientificWorldJournal. 2018;2018:2415489.
doi:10.1155/2018/2415489
19. Sun J, Dong M, Xiang X, Zhang S, Wen D. Notch signaling and targeted therapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* Mar 31 2024;585:216647. doi:10.1016/j.canlet.2024.216647
 20. Larose H, Prokoph N, Matthews JD, et al. Whole Exome Sequencing reveals NOTCH1 mutations in anaplastic large cell lymphoma and points to Notch both as a key pathway and a potential therapeutic target. *Haematologica.* Jun 1 2021;106(6):1693-1704. doi:10.3324/haematol.2019.238766
 21. Isık S, Gunden G, Davutoglu NO, et al. Kronik Lenfositik Lösemi Olgularında NOTCH1 Gen Amplifikasyonu. *Osmangazi Journal of Medicine.* 2023;46(1):104-109. doi:10.20515/otd.1329205
 22. Zou Y, Fan L, Xia Y, et al. NOTCH1 mutation and its prognostic significance in Chinese chronic lymphocytic leukemia: a retrospective study of 317 cases. *Cancer Med.* May 2018;7(5):1689-1696. doi:10.1002/cam4.1396
 23. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* Jan 12 2012;119(2):521-9. doi:10.1182/blood-2011-09-379966
 24. Lopez-Lopez S, Romero de Avila MJ, Hernandez de Leon NC, et al. NOTCH4 Exhibits Anti-Inflammatory Activity in Activated Macrophages by Interfering With Interferon-gamma and TLR4 Signaling. *Front Immunol.* 2021;12:734966. doi:10.3389/fimmu.2021.734966
 25. Nwabo Kamdje AH, Mosna F, Bifari F, et al. Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood.* Jul 14 2011;118(2):380-9. doi:10.1182/blood-2010-12-326694
 26. Rivas JR, Liu Y, Alhakeem SS, et al. Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* Nov 2021;35(11):3188-3200. doi:10.1038/s41375-021-01217-1
 27. Ozden O, Gelmez MY, Çınar S, Deniz G, Aktan M. Intracellular Levels of IL-10 and STAT3 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical and Experimental Health Sciences.* 2023;13(1):99-104. doi:10.33808/clinexphealthsci.1056727
 28. Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Fuentes P, et al. Specific NOTCH1 antibody targets DLL4-induced proliferation, migration, and angiogenesis in NOTCH1-mutated CLL cells. *Oncogene.* Feb 2020;39(6):1185-1197. doi:10.1038/s41388-019-1053-6
 - Cree BAC, Arnold DL, Chataway J, et al. Secondary progressive multiple sclerosis: new insights. *Neurology.* 2021;97(8):378-388. doi:10.1212/WNL.0000000000012323