

Kistik Fibrozis ve Benzer Solunum Yolu Hastalıklarında Silya Yapı ve İşlev Bozuklukları

Cilia Structure and Function Defects in Cystic Fibrosis and Related Respiratory Diseases

Merve ATALAY, Didem DAYANGAÇ ERDEN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye



ÖZ

Hücre yüzeyinde bulunan silyalar kistik fibrozis, primer siliyer diskinezi ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarında yapı ve işlev bozukluğuna uğrayarak hastalık patogenezinde önemli rol oynarlar. Silya oluşumu sırasında özellikle hareketli silya yapısını oluşturan genlerde görülen mutasyonlar sonucu silyanın mikrotübül yapısı bozulur ve silya yüzeyinde çıkıntılar ile büzülme meydana gelir ya da silya yapısı oluşmaz. Silyada oluşan bu deformasyonlar sonucunda silya işlevinin kaybı gerçekleşmekte ve siliyer atım frekansında azalma görülmektedir. Bu azalış, mukusun havayollarındaki yabancı mikroorganizmalardan ve bakterilerden temizlenme mekanizması olarak adlandırılan mukosilyer klirens mekanizmasını bozmaktadır. Mukusun epitel yüzeyden temizlenememesi, fazla üretilmesi ve kalınlaşması sebebiyle ortama göç eden makrofajlar ve nötrofiller sitokin fırtınasına neden olmakta, inflamatuvar yolakların aktiflemesiyle hastalık seyri ağırlaşmaktadır. Bu derlemede kistik fibrozis, primer siliyer diskinezi ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarında hareketli silya oluşumunda görev alan ve doğrudan ya da dolaylı olarak ifade değişimi gösteren genler ve işlevleri özetlenmiştir. İlişkili genlerin ifade değişimleri sonucunda akciğer epitel yüzeyindeki hücreler farklılaşarak akciğer hastalığı patofizyolojisi etkilenmektedir.

Anahtar Sözcükler: Gen ifade profili, Mukosilyer klirens, Silya, Solunum bozuklukları

ABSTRACT

The cilia found on the cell surface contribute to disease pathogenesis in cystic fibrosis, primary ciliary dyskinesia, and chronic obstructive pulmonary diseases by showing defects in structure and function. As a result of mutations in the genes responsible for mobile cilia structure, the microtubule structure is disrupted and protrusions and shrinkage occur in the cilium. These deformations cause loss of cilia function and decrease in ciliary beat frequency. This decrease disrupts the mucociliary clearance mechanism, which is called as the clearance mechanism of mucus from foreign microorganisms and bacteria in the airways. The macrophages and neutrophils migrating to the environment cause cytokine storm due to the inability of mucus to be cleared from the epithelial surface and the disease course exacerbates with the activation of inflammatory pathways. In this review, genes that have a function in mobile cilia formation and that show direct or indirect expression changes in cystic fibrosis, primary ciliary dyskinesia, and chronic obstructive pulmonary diseases are summarized. As a result of change in the expression of these genes, cell differentiation on the lung epithelial surface and pathophysiology of lung diseases are affected.

Key Words: Gene expression profile, Mucociliary clearance, Cilia, Respiration disorders



ATALAY M
DAYANGAÇ ERDEN D

: 0000-0001-6965-422X
: 0000-0002-0236-7565

Çıkar Çatışması / Conflict of Interest: Tüm yazarlar adına, ilgili yazar çıkar çatışması olmadığını belirtir.

Atf yazım şekli / How to cite: Atalay M, Dayangaç Erden D., Kistik Fibrozis ve Benzer Solunum Yolu Hastalıklarında Silya Yapı ve İşlev Bozuklukları. Türkiye Çocuk Hast Derg 2021;15:545-552.

Yazışma Adresi / Correspondence Address:

Didem DAYANGAÇ ERDEN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

E-posta: didayan@hacettepe.edu.tr

Geliş tarihi / Received : 10.01.2021

Kabul tarihi / Accepted : 10.03.2021

Elektronik yayın tarihi : 23.09.2021

Online published

DOI: 10.12956/tchd.857645

GİRİŞ

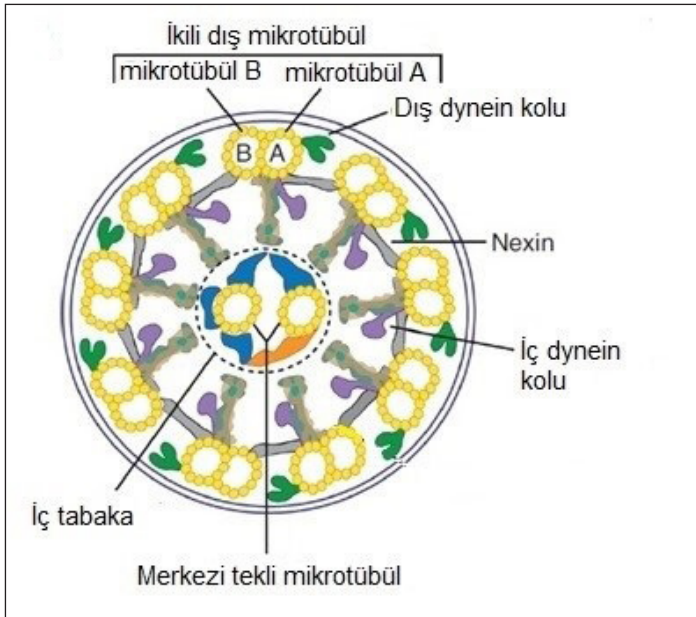
Günümüzde ‘tüy benzeri hücreyel organel’ olarak tanımlanan silyalar, ilk olarak mikroskopun keşfiyle birlikte ‘küçük hareketli ayaklar’ olarak Antony Van Leeuwenhoek tarafından araştırılmıştır (1). Daha sonra yapılan çalışmalarla silyaların hareketsiz yapıda da bulunabileceği keşfedilmiş ve transmisyon elektron mikroskobu ile silya yapısı detaylandırılmıştır (2).

Silya oluşumu silyogenez olarak adlandırılmaktadır (3). Sentriyol çiftlerinden biri hücre zarına yerleşerek bazal cisim adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Diğer sentriyol çifti perisentriyoler matriks denilen hücre zarının alt kısmındaki yüzeyde yerleşim göstermektedir (4). Bu silindirik yapının hücre zarından dışa doğru uzamasıyla aksonem oluşmaktadır. Aksonem yapısına göre silyalar; hareketli (nodal ve motor) ve hareketsiz olarak sınıflandırılmaktadır. Nodal silyaların yapısı 9 çift “a ve b” mikrotübülü içerirken (9+0), motor silyalar 9 çift mikrotübüle ek olarak 2 tane merkezi mikrotübül yapısı (9+2) içermektedir (Şekil 1) (5). Hareketli silyalar; beyindeki beyin omurilik sıvısının, solunum sistemindeki mukusun, spermin hareketlerinden ve solunan parçacıkların dışarı atılmasından sorumludur. Ayrıca embriyo gelişiminde sağ ve sol gövde ekseninin oluşması ile organ yerleşimini düzenlemektedirler. Hareketsiz silyalar (9+0) ise katı bir yapıya sahiptir, kanal ve tübül yapı içindeki sıvı akışını tespit etmekle sorumludur. Özellikle duyu sistemi hücrelerinde görev almaktadırlar. Örneğin retinadaki çubuk ve koni hücrelerinde yer alan silyalarda bazı özelleşmiş reseptörler bulunması sebebiyle bu silyalar ışığı tespit etmektedirler (6).

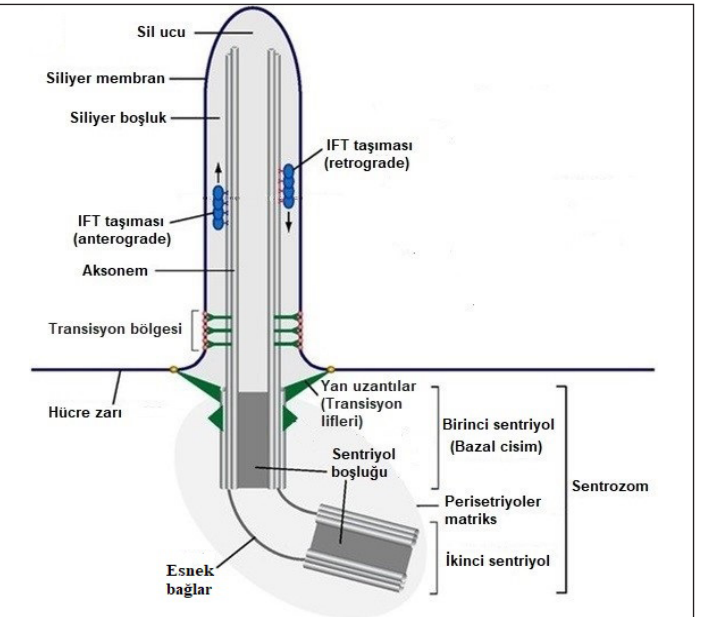
Hareketli silyaların yapısında yer alan 13 alt birimden oluşan “a” ve 11 alt birimden oluşan “b” mikrotübülleri, neksin-dynein regülatör kompleks (NDRC) adı verilen yapı ile birbirine bağlanmaktadır

(7). Neksin, silya yapısındaki iç ve dış dynein kollarını kontrol etmektedir. İç dynein kolu ve dış dynein kolu yapılarının içinde dynein ağır zincirleri bulunur ve bu zincirlerin ATP ile aktifleşmesi ile mikrotübüllerin birbiri üzerinden kayması ve silyanın hareketi sağlanmaktadır (Şekil 1). Bu kayma hareketinin frekansı, silyer atım frekansı olarak adlandırılmaktadır. Mukus ve perisilyer tabaka arasında mukusun ve silyanın hızı arasındaki bağlantı ile hesaplanan bu değer, sağlıklı hücrelerde 12-15 Hz arasında ölçülmektedir (8). Ayrıca silyalar mukus ile sadece mukusun epitel yüzeyden atıldığı yönde yani ileri yönde temas etmektedir ve bu mekanizma mukusun geri yönde akışını önlemektedir. Dış dynein kolu yapısı silya hareketinde silyer atım frekansını düzenlerken, iç dynein kolu ise bükülmeyi ve dalga-benzeri hareketi sağlamaktadır (9).

Silyer matriks silya yapısına direkt temas etmemekte olup; aradaki boşluk silyaların mikrotübül yapısı ve silyer membran arasında çift yönlü bir taşıma sağlayan intraflagellar transport (IFT) alanını oluşturmaktadır. Silyanın oluşumu ve işlevi için gerekli yapı taşları olan tübülün dimerleri bu şekilde taşınmaktadır. Ayrıca bu proteinlerin silyaya giriş-çıkışı ve seçiciliği transisyon bölgesi ve Y bağlantıları ile sağlanmaktadır. Taşıma bazal membrandan silyanın ucuna doğru kinesin proteini ile gerçekleşmekte ve ileri yönde taşınım (anterograd) olarak adlandırılmaktadır (10). Silya ucundan bazal membrana doğru olan taşıma geri yönde (retrograd) olarak adlandırılmakta ve dynein proteini yardımcı eleman olarak kullanılmaktadır. Bu iki yönlü taşımalar sonucunda sabit bir silyer uzunluğa yol açan dinamik bir dengeye ulaşılmaktadır. Taşıma işlemi gerçekleşirken taşıma yönüne bağlı olarak IFT A ve B adı verilen yardımcı molekül grubu kullanılmaktadır (11). Dynein ile birlikte retrograd taşımada yer alan *IFTA* geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu silya ucundaki birikimlerden kaynaklı çıkıntılar



Şekil 1: Silya yapısının yatay kesiti



Şekil 2: Silya yapısının dikey kesiti

gözlenmektedir. Kinesin ile birlikte anterograd taşımada yer alan *IFTB* geninde saptanan mutasyon sonucunda ise silyanın ucuna doğru taşıma gerçekleşmemekte ve silyada toplanma ile büzülmeler gözlemlenmektedir (Şekil 2) (12).

Alt Solunum Yolu Hücreleri ve Silyalı Hücre Farklılaşması

Trakeadaki kıkırdaklı hava yolu, çeşitli seröz, salgı, goblet, kulüp ve siliyer hücre içeren çok sayıda submukozal bez içerir. Bu hücreler bazal, orta ya da farklılaşmamış, silyalı ve salgı hücreleri olarak 4 gruba ayrılmaktadır (13). Yüzey epitel hücre katmanının altında yer alan bazal hücreler, hava yolları boyunca yer alıp; farklılaşma ve onarım sırasında belirli transkripsiyon faktörleri yardımıyla silyalı, salgı ve goblet hücrelerinin oluştuğu progenitör hücreler olarak görev yaparlar (14).

Bu farklılaşma temel olarak Notch sinyali varlığı ve seviyesine göre belirlenmektedir. Notch sinyali varlığında salgı hücrelerinden olan kulüp ve seröz hücreleri oluşmaktadır. Bu hücreler alt solunum yollarındaki küçük salgı bezlerini oluşturmaktadırlar. Kulüp hücreleri SPDEF transkripsiyon faktörü (SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor) varlığında mukusun yapısını oluşturan müsin proteinlerini salgılayan goblet hücrelerini oluşturmaktadır (15). Bu yüzden submukozal bezlerde aynı zamanda müsin oluşumu ve paketlenmesi sağlanmaktadır. Normal şartlarda 3-4 ayda yenilenen silyalı hücre yapısı, hasar olduğunda kulüp hücreleri yardımı ile 14 günde yenilenmektedir (16). Notch sinyalinin olmadığı durumda ise Geminin-coiled coil containing (GMNC) proteinlerinin ve *multiciliate differentiation and DNA synthesis associated cell cycle protein (MCIDAS)*, *Myeloblastosis proto-oncogene (MYB)*, *regulatory factor X (RFX)* genlerinin aktifleşmesiyle sentriyol biyogenez, çok silyalı hücre oluşumu, tek silyalı hücre oluşumu ve özellikle *Forkhead Box J1 (FOXJ1)* geninin ifadesi etkilenmektedir (15).

Mukosilyer Klirens Mekanizması

Mukosilyer klirens, mukusun taşınması yoluyla havayolunun yabancı mikroorganizmalardan ve bakterilerden temizlenme mekanizması olarak tanımlanmaktadır (17). Hava yolu yüzey tabakası 2-5 mm kalınlığındaki mukustan ve 7 mm kalınlığındaki perisilyer tabakadan oluşmaktadır. Hücre zarında görülen aktif iyon geçişleri ile optimal bir silya performansı ve mukusun hidrasyonu sağlanmaktadır (18). Bu aktif iyon geçişleri arasında yer alan Na⁺ alımı ENaC reseptörleri, Cl⁻ salınımı cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) ve CaCC kanalları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Ayrıca Na, K ve Na-K-2Cl ortak taşıyıcıları ile birlikte elektrokimyasal bir fark oluşturulmaktadır. Mukus tabakası salgı hücrelerinden salınan müsin proteinlerinin karışımı ile oluşmaktadır (19). Mukusun jel tabakasını mucin 5B (MUC5B) ve mucin 5AC (MUC5AC) proteinleri oluşturmaktadır (20). Mucin 1 (MUC1) ve mucin 2 (MUC2) ile ilişkili kesin veriler bulunmasa da bazı hipotezler mevcuttur. MUC1'in bakteri enfeksiyonlarının baskılamasında rol oynaması nedeniyle Toll-like reseptörler (TLR) ile bağlantılı olabileceği ve MUC2'nin de aslında sindirim

sistemi mukusunda olmasına rağmen kistik fibrozis (KF) ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarında (KOAH) ifadesi azaldığı için etkisinin olabileceği düşünülmektedir (21).

Ortamda Notch sinyalinin fazla olduğu durumlarda bazal hücreler direkt goblet hücrelerine dönüşmektedir. Bu durum MUC5B ve MUC5AC müsinlerinin fazla miktarda üretilmesine, mukusun kalınlaşmasına ve tıkanıklığa sebep olmaktadır. Fazla miktarda üretimin sonucu olarak mukusun jel yapısı bozulmaktadır. Tıkanıklık sebebiyle ortama göç eden makrofajlar ve nötrofiller sitokin fırtınasına neden olmaktadır (13). Ortamda bakteri enfeksiyonunun olduğu durumlarda ise baskın bir humoral yanıt, enfeksiyona karşı spesifik T yardımcı hücreleri yanıtındaki farklılıklardan dolayı ise zayıf bir hücresel yanıt görülmektedir (22). Enfeksiyonun bitmemesi sebebiyle inflamasyon sürekli devam etmekte ve kronik akciğer hastalıkları görülmektedir.

Kronik Hava Yolu Hastalıklarında Hareketli Silya Yapı ve İşlev Bozuklukları

Bronşların aşırı genişlemesi anlamına gelen bronşektazi, kronik hava yolu sürpüratif hastalıklarının tamamında ortak olarak gözlenmektedir (23). Silyalar normal şartlarda biriken mukusu ve partikülleri akciğerden uzaklaştırmaktadırlar. Fakat bronşektazi durumunda silyaların yok olması veya sayısının azalması sebebiyle, süpürme işlemi gerçekleştirilememektedir. Mukusun birikmesi, mukosilyer klirensin bozulması, bakteri yerleşimi ve inflamasyon bir döngü şeklinde tekrarlanmaktadır. Bu döngü bronş duvarı yıkımına ve genişlemesine yol açan olaylar zincirini ortaya çıkardığı için 'Cole tehlikeli kısır döngüsü' olarak adlandırılan hipotez ile desteklenmektedir (24).

Üst ve alt solunum yolu hastalıkları, alerjik ve alerjik olmayan hastalık grupları ayrı ayrı kümelenildiğinde ortak olarak hareketli silya bozuklukları görülmektedir. Alt solunum yolu hastalıklarından olan primer siliyer diskinezi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve kistik fibrozis alerjik olmayan hastalıklar grubuna girmektedir. Bozuklukların etkisi olarak silyogenezde azalma, siliyer yapıdaki anormallikler ve bozulmuş siliyer hareket gözlemlenmektedir (25). Zayıf yapıda silya oluşumuna *FOXJ1*, *centriolar coiled-coil protein 110 (Cp110)* ve *tumor protein p73 (Tap73)* genlerindeki mutasyonlar neden olmaktadır (26). Aynı zamanda *MCIDAS*, *dynein axonemal heavy chain 5 (DNAH5)* ve *coiled-coil domain containing 39 (CCDC39)* gibi aksonemal motor proteinler, *CyclinO* ve *FOXJ1* tarafından kontrol edilmekte olup; *CyclinO* ve *FOXJ1* genlerindeki mutasyonlar silya oluşumunda hatalara neden olmaktadır (27). Tablo 1'de kistik fibrozis, primer siliyer diskinezi ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarında mukosilyer klirens ve silya yapı ve işlevinden sorumlu olan genler özetlenmiştir.

Kistik Fibrozis

Kistik fibrozis, *cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)* genindeki mutasyonlar sonucu otozomal resesif olarak kalıtılan genetik bir hastalıktır. *CFTR* geni kromozomun 7q31.2

Tablo 1: Kistik fibrozis, primer siliyer diskinezi ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarında mukosilyer klirens ve silya yapı ve işlevinden sorumlu olan genler özetlenmiştir.

Referanslar	Gen listesi	Çalışma tipi	
Kistik fibrozis	MsShane ve ark.(56)	<i>IL8</i> (ifadesi artan)	Nazal lavaj sıvısı
	Verhaeghe ve ark.(57)	<i>IL6, IL8, IL1B, bFGF, NFKB, AP-1</i> (ifadesi artan)	Fetal trake hücreleri (CFT-2, NT-1)
	Ross A ve ark.(39)	<i>FOXJ1, NATO</i> (hastalık durumunda mutasyona uğrayan)	Bronşiyal epitel hücre
	Clarke L ve ark.(41)	<i>ADM, AQP9, AREG, GJA1, IGFBP3, NDRG1, TMEM45A</i> (ifadesi artan), <i>SCGB1A1, SPAG6, TEKT1, DNAH9, DNAH12, DNAI1, DNAI2</i> ve <i>DNAAF1</i> (ifadesi azalan)	Nazal epitel hücre 13 bağımsız mikroarray meta-analizi
Primer siliyer diskinezi	Mukherjee I ve ark.(27)	<i>DNAH5, DNAI1, CyclinO, FIG</i> (hastalık durumunda mutasyona uğrayan)	İnteraktom
	Milla C. (50)	<i>ARMC4, C21orf59, CCDC103, CCDC114, CCDC151, CCDC39, CCDC40, CCNO, DNAAF1, DNAAF2, DNAAF3, DNAAF4, DNAAF5, DNAH1, DNAH11, DNAH5, DNAH8, DNAI1, DNAI2, DNAL1, DRC4, HYDRIN, LRRC6, MCIDAS, NME8, OFD1, RPGR, RSPH1, RSPH3, RSPH4A, RSPH9, SPAG1, WDR35, ZMYNND10</i>	Derleme
	Baz-Redón N ve ark. (59)	<i>TEKT1, TTC25, MNS1, EPB41L4A, DNALI1, DNAH5, DNAH6, DNAH7, DNAH8, DNAH9, CCDC11</i>	Periferik kan
Kronik obstrüktif akciğer hastalığı	Tasena H ve ark. (53)	<i>MUC5AC, MUC5B</i> (ifadesi artan)	Bronşiyal biyopsi
	Gohy ve ark. (54)	<i>MUC5AC</i> (sigara kullanımında ifadesi artan), <i>FOXJ1</i> (ifadesi azalan)	Bronşiyal biyopsi

bölgesinde haritalanmıştır (28). Günümüzde *CFTR* geninde 2000'den fazla mutasyon tanımlanmış olup; mutasyonlar etnik kökene bağlı olarak değişiklik göstermektedir (29,30). Genetik olarak heterojen bir toplum olan Türk toplumunda görülen mutasyonlar da Avrupa toplumlarından farklıdır (30). *CFTR* proteini endoplazmik retikulumdan salgılandıktan sonra golgi cisimciğinde glikolize olmakta, epitel hücrelerin apikal membranına yerleşip klor kanalı ve bikarbonat iyonlarının taşınımında mediatör görevi göstermektedir (31). cAMP ve protein kinaz A ile aktifleşen *CFTR* proteini epitel yüzeydeki sıvı homeostazisi ile birlikte diğer klor kanallarının ve epitel sodyum kanallarının regülasyonundan sorumludur (32). Na⁺ kanallarından biri olan ENaC ve Na⁺/K⁺ ATPaz pompalarıyla birlikte Na⁺ emilimini ve glutatyon gibi küçük moleküllerin geçişinin de düzenlenmesinde görev almaktadır (33).

Kistik fibrozis hastalarının hava yollarında iyon dengesinin bozulması ile birlikte mukus birikimi ve bakteri yerleşimine uygun bir ortam oluşmaktadır (34). Silyaların düzgün çalışmaması ve mukosilyer klirensin bozulması, hava yolundaki inflamasyonu ve enfeksiyonları beraberinde getirmektedir. Mukosilyer klirensin azalması ile birlikte IL-8 ve IL-6 ifadelerindeki artış, epitel hücrelerde etkilenen temel yolağın inflamasyon yanıtı olduğunu göstermektedir (35). Ayrıca *CFTR* ile ilişkili yollarda (iyon transferi, Nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB) ve Activator protein 1 (AP1) sinyal yolları, IL-1 β , bFGF IKK-bağımlı I κ B- α ve ERK aktivasyonu yolları) görev alan genlerin (adezyon molekülleri, kemokinler, sitokin/büyüme faktörleri, sitokin reseptörleri, matriks yeniden modellemede görev alan genler) ifadesinde azalış saptanmıştır. IL-8 promotöründe AP-1

bağlanma bölgeleri tespit edilmiş olup; hastalık durumunda IL-8'de meydana gelen artışın AP-1 aktivasyonuna yol açabileceği ve bu aktivasyonun kistik fibrozis patolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Mutant *CFTR* ile NFkB ve AP-1 aktivasyonu arasındaki ilişki henüz aydınlatılmamış olsa da *CFTR* proteininin katlanması ve taşınması sırasında meydana gelen hatalar sonucu NFkB ve AP-1 yollarının aktive edildiği düşünülmektedir (36).

Farklı gruplar tarafından gerçekleştirilen transkriptom çalışmalarının sonucunda ortak olarak hastalarda immün cevabın sürekli uyarılması ile bitmeyen bir inflamasyon ve ona eşlik eden hastalıklar saptanmıştır. Ayrıca mukosilyer klirens ve inflamatuvar yolların araştırıldığı çalışmalarda silyanın yapısı ve işlevinin de dolaylı olarak bozulduğu savunulmaktadır. Andrea J. Ross ve ark.'larının (37) hava yolu epitel biyolojisi ve farklılaşmasını araştırdıkları transkriptom çalışmasında hareketli silyogenezin en önemli düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin *FOXJ1* ve *NOTO* olduğu saptanmıştır. 326 potansiyel *FOXJ1* bağımlı siliyer faktör tanımlanmış ve olgunlaşan akciğer epitelinde ifadelerinin arttığı, *FOXJ1* yokluğunda ise siliyer faktörlerin ifadelerinin azaldığı bulunmuştur. *FOXJ1* varlığında bronşiyal epitel hücrelerdeki mukosilyer farklılaşmanın gerçekleştiği belirlenmiş olup; hücre farklılaşması sırasında transkripsiyonel olarak düzenlenen çeşitli sinyal yolları ile gen ağları oluşturulmuştur. Ostrowski ve ark. (38) silyalı hücreye özgü bir *FOXJ1* promotörü geliştirerek Enhanced green fluorescent protein (EGFP) işaretli transgenik fareler üretmiş ve EGFP oranına göre *FOXJ1*'in trakeal, akciğer ve nazal dokuların epitel yüzeyine yerleştiğini ve protein miktarında

artış görüldüğünü saptamışlardır. Aynı zamanda silya yapısının düzeldiğini ve silya sayısının arttığını göstermişlerdir. Bu nedenle kistik fibroziste FOXJ1'in tedavi hedefi olarak kullanılabileceği savunulmuştur. Clarke ve ark.'ları (39) ise F508del homozigot hastalardan elde edilen nazal epitel hücreleri ile gerçekleştirdikleri transkriptom çalışmasında; hastalarda hücre çoğalmasında görevli genlerin (*ADM*, *AQP9*, *AREG*, *GJA1*, *IGFBP3*, *NDRG1* ve *TMEM45A*) ifadesinin arttığı ve silya oluşumunda görevli genlerin (*SCGB1A1*, *SPAG6* ve *TEKT1*) ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Ayrıca çalışma kapsamı genişletilip 13 farklı transkriptomik verinin bir arada analiz edildiği meta-analiz çalışmasında, mukus oluşumu ve klirensi ile ilişkili aksonemal genler olan *DNAH9*, *DNAH12*, *DNAI1*, *DNAI2* ve *DNAAF1* ifadesinin azaldığı, silyum veya sperm flagellum fonksiyonunda rol oynayan genlerin ifadesinin azaldığı saptanmıştır (40). *DNAH9* ve *DNAH12* dış dynein kolu yapısını, *DNAI1* ve *DNAI2* ise iç dynein kolu yapısını oluşturan proteinler olup; *DNAAF1* siliyer yapının stabilitesi için gereklidir (41-43). Mutasyonlar sebebiyle bu genlerin ifadelerindeki azalma, silya yapısında ve işlevinde bozukluğa sebep olmaktadır. Mutasyonlara ek olarak mukosilyer klirensin bozulması sonucunda CFTR işlevinin azalmasının hava yolundaki silya hareketini azalttığı ve böylece hastalık fenotipinin oluşabileceği düşünülmektedir.

Primer Siliyer Diskinezi (PSD)

Primer siliyer diskinezi (PSD), silyaların yapı ve fonksiyonunda doğum öncesinde oluşan bazı bozukluklar ve anormalliklerden kaynaklanmaktadır. PSD genellikle otozomal resesif olarak kalıtılmakla birlikte, X' e bağlı kalıtımın nadir vakaları bildirilmiştir. PSD hastalarında embriyonik dönemde nodal silya hatalarından dolayı organ yerleşiminde situs-inversus gözlemlenmektedir. Mukosilyer klirensin bozulması ve kısırılık sık görülen klinik bulgulardır. PSD' den sorumlu yaklaşık 50 gen tanımlanmış olup; hastalık siliyer atım frekansının bozulması ve siliyer atım paternindeki değişiklikler ile karakterize olmaktadır (44). PSD sıklığının 15000-16000 yeni doğanda 1 ortaya çıktığı rapor edilmektedir ve bu sıklık akraba evliliğinin fazla olduğu Türk toplumu gibi toplumlarda daha yüksektir (45).

PSD, %65'inde dış dynein kolunda ve/veya iç dynein kolunda meydana gelen mutasyonlar sonucu görülmektedir (46). *ARMC4*, *C21orf59*, *CCDC103*, *CCDC114*, *CCDC151*, *NME8*, *MNS1*, *DNAH5*, *DNAH6*, *DNAH8*, *DNAH9*, *DNAH11*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAL1* ve *TTC25* dış dynein kolunun; *CCDC39*, *CCDC40*, *DNAH1*, *DNAH7* ve *DNAL1* iç dynein kolunun oluşumundan sorumlu genlerdir. Ayrıca iç dynein kolunda *RSPH1*, *RSPH3*, *RSPH4A* ve *RSPH9* genleri tarafından radyal bağlantı yapısı oluşmaktadır. İç ve dış dynein kolu yapılarının ikisinde de ortak etkili olduğu düşünülen *DNAAF1*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *DNAAF4*, *DNAAF5*, *LRR6*, *SPAG1* ve *ZMYND10* genlerindeki mutasyonlar sonucunda ise hastalık ciddiyetinde artış görülmektedir. Kistik fibroziste de ifadesi azalan genlerin

yanında *DNAH5* ve *DNAI1* gibi genlerindeki mutasyonlar sonucu iç dynein kolunun bağlanma kompleksinde, protein taşınmasında hatalar meydana gelmektedir ve ATP bağımlı silya hareketi düzgün gerçekleşmemektedir. Mikrotübüller üzerinde etkili olduğu bilinen *EPB41L4A* ve *RPGR* genleri silyaların aksonem yapısında hatalara neden olmakta ve silya hareketi bozulmaktadır. Hastaların bir kısmında da CCNO mutasyonu sebebiyle sentriyol oluşumunda hatalar meydana geldiği için silya sayısı azalmaktadır. CCNO'ya ek olarak silya sayısı azalmasına neden olan *MCIDAS*, *OFD1*, *WDR5* ve *TEKT1* genleri de bulunmaktadır. Bu genlerin FOXJ1 üzerindeki etkilerinden dolayı silyogenez, siliyer atım frekansı ve paternindeki değişikliklere sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *DRC1*, *DRC2*, *DRC4* ve *HYDIN* genlerindeki mutasyonlar sonucunda neksin-dynein kompleksi bozulmakta ve silya hareketi düzgün gerçekleşmemektedir (47,48). Maiti ve ark.'ları (49) tarafından PSD hastalarının nazal epitel hücrelerinde genom çapında bir tarama gerçekleştirilmiş ve FOXJ1 geninin PSD fenotiplerinden sorumlu olduğunu düşündüren hiçbir mutasyon bulunamamıştır. 2019 yılında Mukherjee ve ark.'ları (50) FOXJ1 aracılı sinyal ağlarının hareketli silyalar interaktomunun en önemli belirleyicisi olduğunu göstermiş ve FOXJ1'in aracılık ettiği protein-protein etkileşim ağını biyoinformatik veri tabanları yardımı ile oluşturmuşlardır. Bu analizler sonucunda FOXJ1 induced genes (*FIG*) genleri tarafından sentezlenen proteinlerle etkileşime giren ve silyalı hücrelerde ifade edilen yaklaşık 120 protein tanımlanmıştır. Örneğin silyogenez etki ettiği bilinen *MCIDAS* geni hareketli silyaların sayısının azalmasına neden olmakta ve mukosilyer klirens mekanizmasına etki etmektedir. Bu nedenlerle *MCIDAS* silyalı hücre farklılaşması için CyclinO/FOXJ1'in önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır. Silyalar ile ilişkili sinyal yollarında ise (Notch, Wnt, Hedgehog, Toll- benzeri reseptör) yer alan proteinler aynı zamanda FOXJ1'in etki ettiği olası siliyer biyoloji ve fonksiyon ile ilişkili olan ağ haritasında da yer almaktadır. Ayrıca FOXJ1'in Hedgehog ve Wnt sinyal yollarında yer alması, PSD hastalarında görülen gelişim bozukluklarının FOXJ1 kaynaklı olabileceğini desteklemektedir.

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) bronşların ve hava yollarında uzun süreli tıkanma ile ortaya çıkmakta olup genellikle erişkin yaş grubunda görülse de sigara içen çocuklarda da görülebilmektedir. Solunum güclüğü, öksürük ve nefes darlığı gibi şikayetlerle karakterize olan kronik bir hastalıktır. Klinik ciddiyete göre hafif, orta, ağır ve çok ağır olacak şekilde 4 gruba ayrılmaktadır (51).

Tasena ve ark.'ları (52) KOAH hastalarında görülen hiper sekresyonun altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak üzere, hastalardan elde ettikleri bronşiyal biyopsileri kullanarak 20 adet mikroRNA (miRNA) ve miRNA hedefleri olan 539

adet mRNA tanımlayarak, miRNA-mRNA etkileşim ağlarını oluşturmuşlardır (Tablo I). Analizler sonucunda mukosilyer klirens etki ettiği bilinen ve mukusun jel yapısını oluşturan *MUC5AC* ve *MUC5B* ifadesinin KOAH hastalarında arttığı belirlenmiştir (52). Hiper sekresyon sonucunda epitel yüzeyde görülen tıkanıklık sonucunda mukus klirensi bozulmaktadır. Epitel hücre üzerindeki silyalar, silya fonksiyonunun önemli bir ölçüsü olan silyer atım frekansı ile mukosilyer klirens katkıda bulunmaktadır (53). 2012 yılında Yaghi ve ark.'ları (54) silya atım frekansının KOAH şiddeti ile ilişkisini orta ve ağır seyirli hastalarda nazal silya atım frekansının azaldığını saptamışlardır. Aynı zamanda silyer fonksiyon bozukluğunun KOAH'ta mukosilyer klirensi etkileyebileceğini ve enfeksiyonlara yol açabileceğini göstermişlerdir. İstatistiksel olarak anlamlı görülmemesine rağmen orta ve ağır seyirli KOAH hastalarında silya atım frekansı önemli ölçüde baskılanmıştır. Kontrol bireylere kıyasla, KOAH hastalarının nazal silya atım frekansının çeşitli farmakolojik ajanlarla (YM976 ve tiotropium bromür) arttırılabildiği gösterilmiş olup; silyalar yardımıyla hava yolundaki yabancı maddelerin temizlenmesinde bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca KOAH hastalarında sigaranın epigenetik etkilerle ortaya çıkardığı değişikliklerin, silyalarda çeşitli bozukluklara yol açtığı bilinmektedir. Gohy ve ark.'larının (53) 2019 yılında yaptığı bir çalışmaya göre KOAH'lı akciğer örneklerinde, kontrollere kıyasla *MUC5AC* ifadesi artmış, α -tubulin ve *FOXJ1* ifadesi azalmıştır. Aktif sigara içen hastalarda, sigara içmeyenlere göre daha yüksek *MUC5AC* ifadesi saptanmış ve bu ifade değişimi sigara kullanımına bağlanmıştır. Sonuç olarak silyalı hücrelerin oluşumundaki hatalar, silyer uzunluğun ve atım frekansının azalmasına neden olmakta ve bu durumun KOAH'ta bozulmuş mukosilyer klirens ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir. Mekanik yöntemlere ek olarak silya atım frekansı ve mukosilyer klirens mekanizması ile ilişkili yolların moleküler düzeyde daha fazla araştırılması gerekmektedir.

SONUÇ

Memelilerde transkripsiyon faktörü olan *FOXJ1*, hareketli silya oluşumunda rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda *FOXJ1* aktivitesinden yoksun farelerin, hareketli silya sayısında azalma veya kayıp saptanmış olup; *FOXJ1* geninin hareketli silya oluşumunda temel bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Solunum yolu hastalıkları arasında hareketli silya yapı bozuklukları ve mukosilyer klirens mekanizması ortak olarak belirlenmiştir. *PSD*, *KF* ve KOAH'da *FOXJ1* geninin doğrudan ya da dolaylı olarak ifadesinin değişimi ile akciğer patofizyolojisi etkilenmektedir. Aynı zamanda *FOXJ1* ifadesinin artışı silya yapısını, sayısını ve silya atım frekansını da düzeltmektedir (55).

Grubumuz tarafından kistik fibrozis hastalarında fenotipik ciddiyeti etkileyen genlerin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen hedefli transkriptomik çalışmasında hasta ve kontrol bireylerin

transkript seviyeleri karşılaştırılmıştır (56). Silya yapı ve işlevi bakımından değerlendirdiğimiz ön çalışma sonuçlarımıza göre mukosilyer klirens etki edebilecek *FAS* (kat değişimi: 3.68), *ICAM1* (kat değişimi: 4.29), *IL6* (kat değişimi: 9.6), *IL10* (kat değişimi: 4.67), *TLR2* (kat değişimi: 2.05), *TLR4* (kat değişimi: 2.88), *TNF* (kat değişimi: 5.5), *CCl2* (kat değişimi: 9.01), *CXCL2* (kat değişimi: 3.97) ve *CXCL1* (kat değişimi: 2.8) genlerinin ifadelerinde kontrol grubuna göre artış saptanmıştır. *CXCL8* (kat değişimi: 2.08) ifadesinde ise azalış görülmüştür. Yolak analizleri sonucunda *TNF*, *IL-17*, *NF-kappa B*, *NLRP3* inflamazom ve sitokin-sitokin reseptör sinyal yollarının etkilendiği gösterilmiştir. Hastalarda kontrol bireylere göre artış gösteren *TNF* ve *TNF* reseptörlerinin bulunduğu sinyal yolağının aktifleşmesi sonucu *NF kappa B* aracılı proinflamatuvar sitokinlerin salınımı gerçekleşmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, nekroptozis yolağının aktifleşmesinde görevli nekroptozom komplekslerinin oluşmasını tetikleyerek hücrede *NLRP3* inflamazom yolağını harekete geçirdiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; *PSD*, *KF* ve KOAH gibi solunum yolu hastalıklarında hareketli silya yapı ve işlev bozukluklarının araştırılması; sonuçların mukosilyer klirens ve inflamasyon açılarından değerlendirilmesi ile hastalıkların moleküler temellerinin aydınlatılması ve yeni tedavi hedeflerinin saptanması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Beales P, Jackson P. Cilia - the prodigal organelle. *Cilia* 2012;1:1.
2. Tsang K, Tipoe G, Mak J, Sun J, Wong M, Leung R, et al. Ciliary central microtubular orientation is of no clinical significance in bronchiectasis. *Respir Med* 2005;99:290-7.
3. Ishikawa H, Marshall W. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:222-34.
4. Bustamante-Marin X, Ostrowski L. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9:a028241.
5. Choksi S, Lauter G, Swoboda P, Roy S. Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development* 2014;141:1427-41.
6. Brown J, Witman G. Cilia and Diseases. *Bioscience* 2014;64:1126-37.
7. Tilley A, Walters M, Shaykhiev R, Crystal R. Cilia Dysfunction in Lung Disease. *Annu Rev Physiol* 2015;77:379-406.
8. Goodenough U, Heuser J. Outer and inner dynein arms of cilia and flagella. *Cell* 1985;41:341-2.
9. Gueron S, Liron N. Ciliary motion modeling, and dynamic multicilia interactions. *Biophys J* 1992;63:1045-58.
10. Pazour G, Rosenbaum J. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol* 2002;12:551-5.
11. Martin-Hurtado A, Lastres-Becker I, Cuadrado A, Garcia-Gonzalo F. NRF2 and Primary Cilia: An Emerging Partnership. *Antioxidants (Basel)* 2020;9:475.
12. Rosenbaum J. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3: 813-25.
13. Whitsett J. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann Am Thorac Soc* 2018;15(Suppl3):S143-8.

14. Tadokoro T, Wang Y, Barak L, Bai Y, Randell S, Hogan B. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111: E3641-9.
15. Turner J, Roger J, Fitau J, Combe D, Giddings J, Heeke G, et al. Goblet Cells Are Derived from aFOXJ1-Expressing Progenitor in a Human Airway Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:276-84.
16. Look D, Walter M, Williamson M, Pang L, You Y, Sreshta J, et al. Effects of Paramyxoviral Infection on Airway Epithelial Cell *FOXJ1* Expression, Ciliogenesis, and Mucociliary Function. *Am J Pathol* 2001;159:2055-69.
17. Wanner A, Salathé M, O'Riordan T. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1868-902.
18. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J* 1999;13:1177-88.
19. Rubin B. Mucus and Mucins. *Otolaryngol Clin North Am* 2010;43:27-34.
20. Bonser L, Erle D. Airway Mucus and Asthma: The Role of *MUC5AC* and *MUC5B*. *J Clin Med* 2017;6:112.
21. Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R. Regulation of Airway Mucin Gene Expression. *Annu Rev Physiol* 2008;70:405-29.
22. Chilvers M, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 2000;1:27-34.
23. Cantin L, Bankier A, Eisenberg R. Bronchiectasis. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193:W158-W171.
24. Lewis B, Patial S, Saini Y. Immunopathology of Airway Surface Liquid Dehydration Disease. *J Immunol Res* 2019;2019:2180409.
25. Courtney J, Ennis M, Elborn J. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004;3:223-31.
26. Guan W, Peng Y, Zi X, Tan K, He T, Zhong N, et al. Motile Ciliary Disorders in Chronic Airway Inflammatory Diseases: Critical Target for Interventions. *Curr Allergy Asthma Rep* 2018;18:48.
27. Mukherjee I, Roy S, Chakrabarti S. Identification of Important Effector Proteins in the *FOXJ1* Transcriptional Network Associated With Ciliogenesis and Ciliary Function. *Front Genet* 2019;10:23.
28. Rafeeq M, Murad H. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med* 2017;15:84.
29. Clinical and Functional translation of CFTR. Erişim tarihi: 12 Mart 2021. Available from: <https://www.CFTR2.org>.
30. Cystic Fibrosis Mutation Database. Erişim tarihi: 12 Mart 2021. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/>
31. Richards C, Bradley L, Amos J, Allitto B, Grody W, Maddalena A, et al. Standards and Guidelines for *CFTR* Mutation Testing. *Genet Med* 2002;4:379-91.
32. Dayangaç-Erden D, Atalay M, Emirlioğlu N, Hizal M, Polat S, Özçelik U, et al. Mutations of the *CFTR* gene and novel variants in Turkish patients with cystic fibrosis: 24-years experience. *Clin Chim Acta* 2020;510:252-9.
33. Cutting G. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 2015;16:45-56.
34. Ratjen F, Bell S, Rowe S, Goss C, Quittner A, Bush A. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15010.
35. Tsui L, Dorfman R. The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a009472.
36. Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Krahl A, Gielen J, Barneier H, et al. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;4:41-8.
37. McShane D, Davies J, Wodehouse T, Bush A, Geddes D, Alton E. Normal nasal mucociliary clearance in CF children: evidence against a *CFTR*-related defect. *Eur Respir J* 2004;24:95-100.
38. Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn S, et al. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1982-94.
39. Ross A, Dailey L, Brighton L, Devlin R. Transcriptional Profiling of Mucociliary Differentiation in Human Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:169-85.
40. Ostrowski L, Yin W, Diggs P, Rogers T, O'Neal W, Grubb B. Expression of *CFTR* from a ciliated cell-specific promoter is ineffective at correcting nasal potential difference in CF mice. *Gene Ther* 2007;14:1492-501.
41. Clarke L, Sousa L, Amaral M. WS20.3 Changes in transcriptomics of native nasal epithelium expressing F508del-*CFTR* and intersecting data from comparable studies. *J Cyst Fibros* 2013;14:38.
42. Clarke L, Botelho H, Sousa L, Falcao A, Amaral M. Transcriptome meta-analysis reveals common differential and global gene expression profiles in cystic fibrosis and other respiratory disorders and identifies *CFTR* regulators. *Genomics* 2015;106:268-77.
43. Maiti A, Mattéi M, Jorissen M, Volz A, Zeigler A, Bouvagnet P. Identification, tissue specific expression, and chromosomal localisation of several human dynein heavy chain genes. *Eur J Hum Genet* 2000;8:923-32.
44. Loges N, Olbrich H, Fenske L, Mussaffi H, Horvath J, Fliegau M, et al. *DNAI2* Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Defects in the Outer Dynein Arm. *Am J Hum Genet* 2008;83:547-58.
45. Horani A, Ferkol T. Advances in the Genetics of Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest* 2018;154:645-52.
46. Baz-Redón N, Rovira-Amigo S, Camats-Tarruella N, Fernández-Cancio M, Garrido-Pontnou M, Antolín M, et al. Role of Immunofluorescence and Molecular Diagnosis in the Characterization of Primary Ciliary Dyskinesia. *Arch Bronconeumol* 2019;55:439-41.
47. Meeks M, Bush A. Primary ciliary dyskinesia (PCD). *Pediatr Pulmonol* 2000;29:307-16.
48. Emirlioğlu N, Taşkıran E, Koşukcu C, Bilgiç E, Atilla P, Kaya B, et al. Genotype and phenotype evaluation of patients with primary ciliary dyskinesia: First results from Turkey. *Pediatr Pulmonol* 2020;55:383-93.
49. Baz-Redón N, Rovira-Amigo S, Paramonov I, Castillo-Corullón S, Roig M, Antolín M, et al. Implementation of a gene panel for genetic diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Arch Bronconeumol* 2020;S0300-2896:30073-9.
50. Milla C. The evolving spectrum of ciliopathies and respiratory disease. *Curr Opin Pediatr* 2016;28:339-47.
51. Maiti A, Bartoloni L, Mitchison H, Meeks M, Chung E, Spiden S, et al. No deleterious mutations in the *FOXJ1* (alias *HFH-4*) gene in patients with Primary Ciliary Dyskinesia (PCD). *Cytogenet Genome Res* 2000;90:119-22.
52. Han M, Agusti A, Calverley P, Celli B, Criner G, Curtis J, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:598-604.
53. Tasena H, Faiz A, Timens W, Noordhoek J, Hylkema M, Gosens R, et al. microRNA-mRNA regulatory networks underlying chronic mucus hypersecretion in COPD. *Eur Respir J* 2018;52:1701556.
54. Gohy S, Carlier F, Fregimilicka C, Detry B, Lecocq M, Ladjemi M, et al. Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* 2019;9:17963.

55. Yaghi A, Zaman A, Cox G, Dolovich M. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respir Med* 2012;106:1139-47.
56. McShane D, Davies JC, Wodehouse T, Bush A, Geddes D, Alton W. Normal nasal mucociliary clearance in CF children: evidence against a CFTR-related defect. *Eur Respir J* 2004;24:95-100.
57. Verhaeghe C, Delbecq K, de Leval L, Oury C, Bours V. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J Cyst Fibros* 2007; 6:304-8.
58. Davis SD, Rosenfeld M, Lee HS, Ferkol TW, Sagel SD, Dell SD et al. Primary ciliary dyskinesia: longitudinal study of lung disease by ultrastructure defect and genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:190-8.
59. Baz-Redón N, Rovira-Amigo S, Camats-Tarruella N, Fernández-Cancio M, Garrido-Pontnou M, Antolín M, et al. Role of Immunofluorescence and Molecular Diagnosis in the Characterization of Primary Ciliary Dyskinesia. *Arch Bronconeumol (Engl Ed)* 2019; 55:439-41.
60. Yu X, Ng C, Habacher H, Roy S. FOXJ1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat Genet* 2008;40:1445-53.
61. Ekinci İ, Hızal M, Emirlioğlu N, Özçelik U, Yalçın E, Doğru D, et al. Differentially expressed genes associated with disease severity in siblings with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2021; 56:910-20.