



Cilia, ciliaire functie en dysfunctie

Trefwoorden

- trilharen
- trilhaaractiviteit
- dyskinesie
- allergie

Samenvatting

Trilharen, of cilia, zijn een essentieel onderdeel van het merendeel van de ademhalings-slijmvliescellen van de neus tot in de longen. Deze uitstulpingen van de buitenste (apicale) celwand zijn de motor van het mucociliair transport. Hun hooggespecialiseerde werking (slagpatroon) vindt zijn basis in een vrij complexe en unieke ultrastructuur. Mucociliair transport zorgt voor de afvoer van slijm met de daarin gevangen stofdeeltjes, allergenen, bacteriën en andere microorganismen, partikels en dergelijke in de richting van de (neus)keelholte. Het is essentieel voor de normale werking van de luchtwegen en geldt als een van de belangrijkste specifieke afweermechanismen. Een verstoorde trilhaarwerking leidt tot luchtwegproblemen door stase, inflammatie en infecties. Trilhaarstoornissen kunnen aangeboren zijn (primaire ciliaire dyskinesie, immotiel-ciliën-syndroom) of verworven (secundaire ciliaire dyskinesie). De verworven afwijkingen kunnen rechtstreeks veroorzaakt worden door het agens. Indirect door de ontstekingsreactie van het lichaam maar ook door geneesmiddelen. Interacties tussen allergie en ciliaire (dys)functie vinden we in de lokale ontstekingsreacties met vrijzetten van ciliotoxische stoffen en in de lokale behandeling.

(Ned Tijdschr Allergie 2004;1:4-9)

Auteurs

M. Jorissen
T. Willems

Trilharen, structuur en functie

Een trilhaar of cilium is een uitsteeksel van de apicale membraan van ademhalings-slijmvliescellen. Op het celoppervlak van één zo'n cel bevinden zich ongeveer 200 trilharen met een gemiddelde lengte van 6 µm en een diameter van 0,3 µm. De basale lichaampjes met wortel en basale voet, verankeren de trilharen in het supranucleair cytoplasmatisch netwerk. Vanaf het basaal lichaam is het trilhaar verder opgebouwd, met de klassieke axonema structuur tot aan de top (zie *figuur 1*, op pagina 5). Dit axonema bestaat uit de klassieke '9+2' structuur: negen doubletten van microtubuli, onderling verbonden door middel van buitenste en binnenste dyneïne armen, rond een centraal paar van microtubuli en daarmee verbonden door de spaken (zie *figuur 2*, op pagina 5).

Het grootste deel van het oppervlak van het ademhalings-slijmvlies is bedekt met een tapijt van tril-

haren. Gezamenlijk zorgen zij voor het mucociliair transport. Functioneel maar ook structureel is dit een complexe organisatie op vier niveaus:

1. individuele trilhaar,
2. intracellulaire coördinatie en oriëntatie,
3. intercellulaire coördinatie en oriëntatie,
4. macroscopische transportwegen.¹

1. De individuele trilharen bewegen op een specifieke, gecoördineerde wijze. Enigszins vereenvoudigd bestaat die beweging uit twee hoofdonderdelen. De cyclus begint met de effectieve slag waarbij de 'gestrekte' trilhaar met de top in de gelfase van de mucuslaag het slijm verplaatst, gevolgd door de terugkeerslag waarbij de trilhaar 'gebogen' door de solfase terug naar zijn beginpositie keert (zie *figuur 3*, op pagina 5). De trilhaarslagfrequentie (ciliary beat frequency, CBF) geeft de snelheid aan in slagen per seconde (Hz) van een volledige cyclus. CBF varieert *in vivo* voor de mens van 14 Hz

voor de bovenste luchtwegen tot 18 Hz voor de onderste luchtwegen. *In vitro* is aangetoond dat CBF temperatuursafhankelijk is. Alle activiteit ligt stil rond 4°C en neemt dan rechtlijnig toe tot ongeveer 35°C (13-18 Hz). Boven de 40°C treedt een reversibele frequentiedaling op en vanaf ongeveer 45°C treedt, althans in celkweek, irreversibele schade op.²

2. Naast elkaar staande trilharen – ook over de celgrenzen heen – bewegen normaal in dezelfde richting en ongeveer in fase: coördinatie en oriëntatie. De onderliggende mechanismen van deze ultrastructurele nagenoeg gelijke oriëntatie en van de functionele coördinatie zijn tot op heden niet bekend.

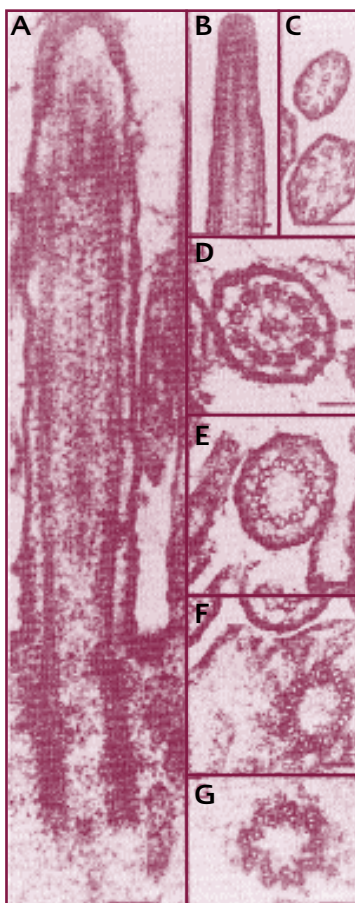
3. Intercellulair speelt communicatie via de 'gap' juncties en Ca^{2+} een rol. Karakteristiek is wel een kleine faseachterstand waardoor een zogenaamde metachronale golfvorm ontstaat. Deze plant zich voort onder een hoek van 45° met de effectieve slagrichting. Dit valt onder het tweede en derde functioneel organisatieniveau.

4. Macroscopisch zijn er een aantal vrij specifieke transportbanen. Deze kunnen opgespoord worden door het aanbrengen van een kleurstof op het

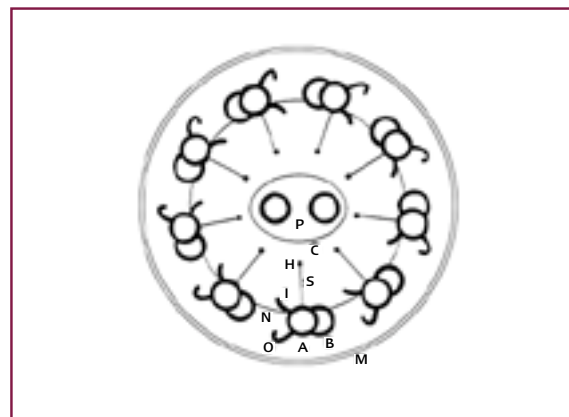
slijmvlies en zijn endoscopisch zichtbaar wanneer voldoende slijm aanwezig is.

Ciliaire dyskinesie

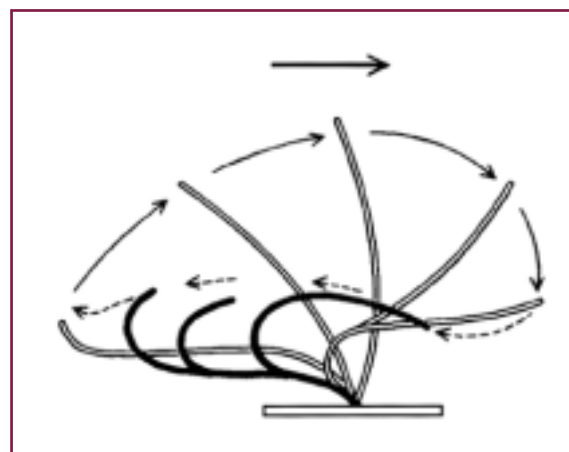
Het mucociliair transport is een van de eerste en belangrijkste verdedigingslinies van de ademhalingswegen. Stofdeeltjes, bacteriën, virussen, toxinen, pollen et cetera worden gevangen in het slijm en voortdurend met hoge snelheid afgevoerd naar de farynx. Op deze wijze blijven de luchtwegen schoon en wordt ons lichaam beschermd. Het ademhalings-slijmvlies en in het bijzonder de trilharen worden wel voortdurend blootgesteld aan deze noxen. Deze stoffen kunnen zelf direct schade, functioneel en/of ultrastructureel, veroorzaken aan de trilharen. Ook de (verdediging) ontstekingsreactie van ons organisme en eventuele infecties kunnen het mucociliair transport aantasten en vertragen. Al deze verworven afwijkingen vallen onder de noemer: secundaire ciliaire dyskinesie (SCD). Wanneer het mucociliair transport niet of onvoldoende werkt, is dit een voorbeschikkende factor voor verdere beschadiging met chronische inflammatie of infecties als gevolg. Aldus kan een vicieuze cirkel ontstaan.



Figuur 1. (A) overlangse doorsnede van een trilhaar, van basaal lichaam tot de top, (B) in de top wordt de diameter van de trilhaar kleiner, (C-G) verschillende dwarse doorsneden van de trilhaar gaande van (C) top, (D) axoneem, (E) 'neklace' of hals, (F, G) tot in het cytoplasma.

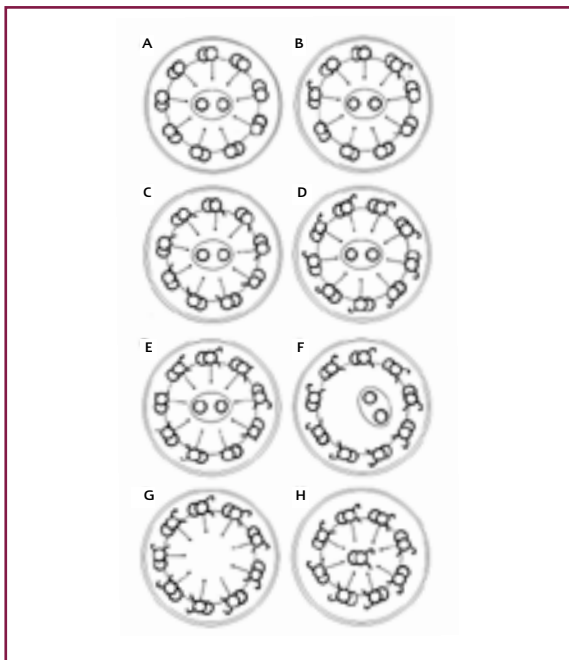


Figuur 2. Schematische voorstelling van een dwarse doorsnede van een trilhaar: M: celmembraan N: 'nexin' link A: microtubulus A B: microtubulus B S: spaak H: hoofd van een spaak O: buitenste dyneïne arm I: binnenste dyneïne arm C: centrale 'sheath' P: centrale paar microtubuli



Figuur 3. Schematische voorstelling van een volledige trilhaarslagbeweging. De bovenste zwarte pijl toont de richting van het mucociliair transport. De volle pijlen tonen de effectieve slag, de gestippelde pijlen de herstelslag.

Figuur 4. Schematische voorstelling van de meest voorkomende primaire afwijkingen in een trilhaar: (A) buitenste en binnenste dyneïne deficiëntie, (B) partiële buitenste en binnenste dyneïne deficiëntie, (C) buitenste dyneïne deficiëntie, (D) binnenste dyneïne deficiëntie, (E) verkorting van de buitenste en binnenste dyneïne armen, (F) afwezigheid van spaken, (G) afwezigheid van centrale paar en (H) afwezigheid van centrale paar met transpositie van een doublet.



Trilhaarafwijkingen kunnen ook aangeboren zijn: primaire ciliaire dyskinesie (PCD), immotiel ciliën-syndroom. Bij deze personen is het mucociliaire transport totaal afwezig, wat leidt tot chronische inflammatie en infecties van de luchtwegen. Dit heeft chronische sinusitis, bronchitis en bronchiëctasiën tot gevolg.

Erfelijke trilhaarafwijkingen, primaire ciliaire dyskinesie (PCD)

PCD is een autosomaal recessieve aandoening met een incidentie van 1/10.000 tot 1/30.000. Er is een indrukwekkende ultrastructurele en genetische heterogeniteit. Tot 200 genen kunnen een rol spelen bij deze aandoening. Het meest kenmerkend is de chronische, slijmerige neusloop vanaf de geboorte. Daarnaast zijn er ook recidiverende bovenste en onderste luchtwegen infecties inclusief middenoorproblemen. De bronchiale en pulmonaire problemen leiden op termijn tot bronchiëctasiën. Mits een goede behandeling, vooral voor de longen, is er een normale levensverwachting. Samen met intensieve fysiotherapie (tapotage, autogene drainage) om de slijmen naar buiten te brengen, vormen antibiotica bij infectieuze opstoten de hoekstenen van de behandeling. Verder worden ook geregeld mucolytica, bronchusverwijders en steroïden gebruikt. Er is een belangrijke mannelijke hypofertilititeit wegens slechte motiliteit van de spermatozoa. In ongeveer 50% is situs inversus aanwezig: Kartagener's-syndroom. Mucociliair transport is altijd totaal afwezig. De diagno-

se wordt meestal gesteld op basis van transmissie electronenmicroscopisch (TEM) onderzoek van een schraapsel of biopt van trilhaarslijmvlies. Verschillende afwijkingen kunnen hierbij aange troffen worden (zie *figuur 4*). Meest frequent is de dyneïne deficiëntie. Op basis van eigen onderzoek is een volledig normale ultrastructuur de tweede meest voorkomende subgroep (>25%) (zie *figuur 5*, op pagina 7).³ Met TEM kan men dan ook nooit de diagnose uitsluiten. Voor een correcte diagnose is de functionele en ultrastructurele evaluatie van trilharen na ciliogenese in sequentiële cellaagsuspensiecelkweek het meest betrouwbaar.^{4,5} Immers, verworven afwijkingen zijn afwezig na ciliogenese in kweek. De erfelijke afwijkingen komen echter tot expressie en functioneel is het onderscheid veel eenduidiger. Afwezigheid van gecoördineerde trilhaaractiviteit is diagnostisch voor PCD. Aanwezigheid van gecoördineerde trilhaaractiviteit is een uitsluitingscriterium voor PCD.^{6,7} Sinds kort wordt ook bepaling van nasaal stikstofmonoxide (NO) gebruikt als screeningsprocedure.⁸

Verworven trilhaarafwijkingen, secundaire ciliaire dyskinesie

Verworven trilhaarafwijkingen worden meestal aangeduid met de term 'secundaire ciliaire dyskinesie' of SCD. Hoewel het hier om een functionele term gaat worden bijna altijd ultrastructurele afwijkingen bedoeld. Er zijn verschillende etiologische factoren voor de secundaire afwijkingen in trilharen. De meeste zijn terug te brengen tot infecties en inflammaties. Een verhoogd percentage van secundaire afwijkingen is onder meer gevonden na bacteriële en virale infecties, chronische inflammatie van de luchtwegen en blootstelling aan toxische stoffen inclusief gassen. Enkele voorbeelden van mogelijke ultrastructurele SCD afwijkingen zijn terug te vinden in *figuur 6* op pagina 8. De meeste voorkomende afwijkingen betreffen de trilhaarmembraan of het aantal en organisatie van de perifere microtubulaire doubletten.

Infecties

Verkoudheden en virale infecties

In het nasaal slijmvlies van kinderen zijn een aantal trilhaarafwijkingen genoteerd ten gevolge van verschillende respiratoire virusinfecties. Deze zijn gecorreleerd met het algemeen cytolytisch effect van het virus, eerder dan met een specifiek ciliotoxisch effect. Na een periode van twee tot

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

1. Trilharen zijn de motor van het mucociliair transport, één van de belangrijkste eerste lijns verdedigingsmechanismen van ons lichaam.
2. Verworven trilhaarafwijkingen (SCD) kunnen ontstaan door een heel gamma van stoffen, toxinen en factoren. Gelukkig is het klinisch impact van de meeste beperkt.
3. Erfelijke trilhaarafwijkingen (PCD) zijn zeer zeldzaam. Kwalitatieve functionele evaluatie na ciliogenese in kweek is de meest betrouwbare diagnostische parameter.
4. Allergische rhinitis heeft meestal geen weerslag op mucociliair transport, trilhaarfunctie en ultrastructuur.

tien weken verdwijnen deze afwijkingen volledig.⁹

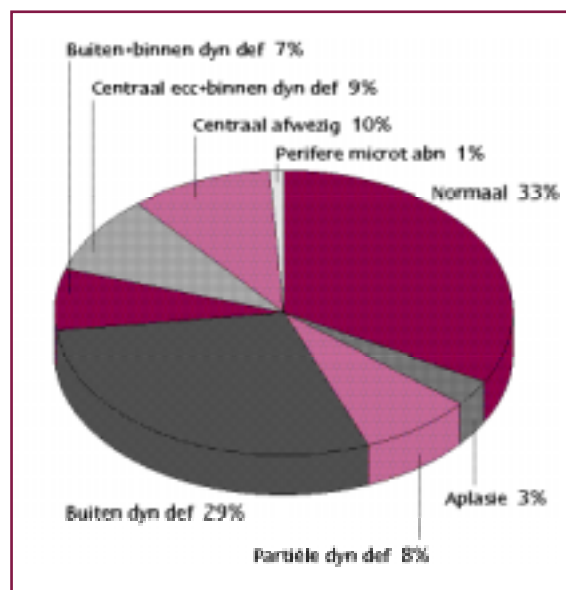
Bacteriële infecties

Toxines van *Haemophilus influenzae* (LPS, LOS), *Pseudomonas aeruginosa* (pseudocyanine, 1 α -hydroxyfenazine) en *Streptococcus pneumoniae* veroorzaken ciliaire dyskinesie, ze vertragen de ciliaire activiteit, vooral *Haemophilus influenzae*.¹⁰ Ook atypische infecties kunnen SCD veroorzaken. *Mycoplasma pneumonia* geeft afwijkingen van het trilhaar 'neklace': het trilhaarmembraan net boven de apicale celmembraan en het basaal lichaampje. Stoornissen van het mucociliair transport zijn vastgesteld tot maanden na de infectie.¹¹

Inflammatie

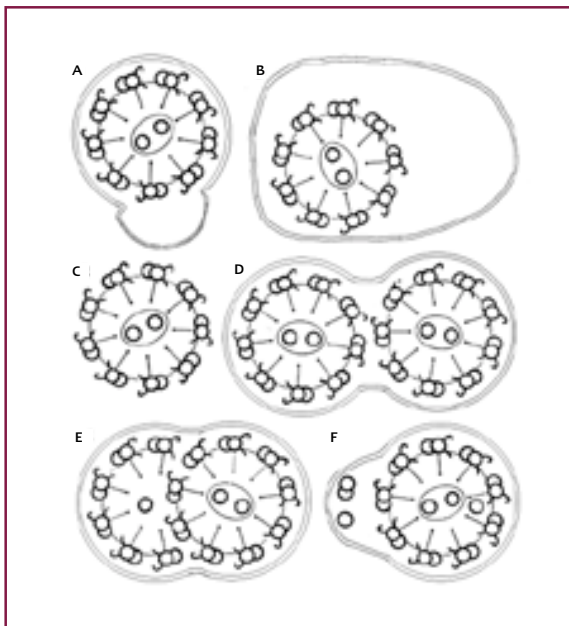
Diverse factoren en mediators, die tijdens ontstekingsreacties aangemaakt en/of vrijgezet worden, hebben een effect op de trilharen. Het elastase van de neutrofiële granulocyten, dat vrijkomt gedurende een infectie, veroorzaakt een zwelling en desorganisatie van de trilhaar en toename van compound cilia.¹² Het toxisch effect van 'major basic protein' (MBP) en 'eosinophilic cationic protein' (ECP) is meer dan voldoende bekend. Wellicht beïnvloeden ook diverse andere cytokinen en mediators de trilhaaractiviteit en/of ultrastructuur. Zo is aangetoond dat de pro-inflammatoire cytokines: IL-1 β en TNF- α in een concentratie van respectievelijk 1 en 10 ng/ml een significante stijging van de CBF-waarden teweeg brengen bij menselijke neusepitheelcellen *in vitro*. Deze stijging kon men verklaren doordat de cytokines de expressie van iNOS doet stijgen. Stikstofmonoxide (NO)

verhoogt de ciliaire motiliteit.¹³ Recentelijk is aangetoond dat ook IL-13 (10 ng/ml) trilharen en trilhaarcellen in belangrijke mate beïnvloedt.¹⁴ *In vitro* veroorzaakt IL-13 niet alleen een daling van de trilhaarslagfrequentie maar het beïnvloedt ook de celdifferentiatie ten nadele van ciliogenese en ten voordele van mucusproducerende cellen.¹⁴ IL-13 geeft dus *in vitro* een verschuiving in de celdifferentiatie, zoals bij langdurig bestaande lagere luchtwegen problemen of bij chronische sinusitis vastgesteld kan worden. Het negatief effect van IL-13 op de CBF kan verklaard worden door een inhibitie van iNOS-expressie.¹⁵ Hierdoor gaat de NO-concentratie en de ciliaire activiteit dalen. Hoewel niet is aangetoond dat allergie op zich in een grote groep SCD veroorzaakt, is het duidelijk dat in bepaalde



Figuur 5. Ultrastructurele verdeling van de PCD patiënten gediagnostiseerd in het UZ Leuven aan de hand van functionele en ultrastructurele trilhaar-analyse na ciliogenese *in vitro* in het sequentiële cellaag-suspensie kweek-model.

Figuur 6. Meest voorkomende secundaire afwijkingen in trilharen : (A) bleb, (B) excess cytoplasma, (C) naakt trilhaar (D) compound cilium/ samengesteld trilhaar volledig, (E) compound cilia onvolledig en (F) supplementaire microtubuli.



omstandigheden van allergische rhinitis verworven afwijkingen kunnen voorkomen. In vergelijking met controle personen, vertonen de rhinitispatiënten een lager percentage aan gecilieerde cellen en een hoger percentage aan slijmbekercellen en basale cellen.¹⁶ Specifieke of een verhoogd percentage ultrastructurele trilhaarafwijkingen zijn evenwel niet aangetoond. Patiënten met ernstige sinusitis hebben dikwijls dezelfde afwijkingen: verlies aan gedifferentieerde cellen. Gaande van naakt epitheel tot basale cellen hyperplasie, dikwijls geassocieerd met 'squamous metaplasia'. Ciliaire dyskinesie bij deze chronische sinusitis is eerder het gevolg van de ziekte dan de oorzaak. Deze afwijkingen vertragen op hun beurt het mucociliair transport en men komt in een vicieuze cirkel terecht van chronische aandoeningen.¹⁷ Bij chronische rhinosinusitis en ook bij acute infectie kan een vertraagd mucociliair transport evenals een verlaagde trilhaarslagfrequentie worden opgemeten. Toch is geen duidelijk verband tussen CBF en mucociliair transport vastgesteld.¹ Wel werd een correlatie tussen het percentage trilhaarafwijkingen en CBF gevonden.¹

Medicaties

Ook de behandeling, in het bijzonder topische behandeling, van de luchtwegen kan de trilharen negatief beïnvloeden. Zeer dikwijls wordt voor intranasale toediening van medicaties gekozen, ook om een systemisch effect te krijgen.¹⁸ Dit laatste komt voor bij problemen van biodegradatie door systemische metabolisering en bij transportbeperkingen door de intestinale membranen. Van

diverse bewaarestoffen is aangetoond dat ze trilharen onomkeerbaar beschadigen. Bijvoorbeeld benzalkoniumchloride^{19,20} en chlorocresol¹⁸, maar ook oplosmiddelen en absorptieregulerende stoffen (glycocholaat, isoprenaline, cyclodextrines, et cetera) kunnen de trilhaarslag vertragen of verhogen.^{18,21} Ten slotte kunnen therapeutische substanties oude antihistaminica zoals diphenhydramine ciliotoxisch zijn, zeker *in vitro*.¹⁸ Bij ontwikkeling van medicaties dient men rekening te houden met de resultaten van functionele en ultrastructurele ciliotoxiciteitsstudies *in vitro* om te voorkomen dat, zeker in geval van chronisch gebruik, het ademhalings-slijmvlies zwaar beschadigd wordt.

SCD en allergie

In de overgrote meerderheid van allergische rhinitispatiënten kan geen ciliotoxiciteit en geen SCD aangetoond worden. In een vergevorderd stadium zijn er echter wel trilhaarafwijkingen of afwijkingen in verhoudingen en de morfologie van de verschillende celtypes mogelijk. Met een verschuiving naar slijmproducerende cellen en 'desquamated' cellen. In de ernstige gevallen van allergische rhinitis, bestaat het slijmvlies niet langer uit verschillende cellagen, het is eerder 'enkelvoudig-eenlagig', met enkel ongedifferentieerde cellen en zelfs cellen die los komen van het slijmvlies.²²

Conclusie

Trilharen spelen een belangrijke rol in de eerste verdedigingslinie van het lichaam: mucociliair transport. Naast erfelijke factoren zijn er tal van andere factoren die de werking van het transport kunnen verstoren. Vooral toxische stoffen, infecties, inflammaties maar ook farmacologische stoffen kunnen de structuur en/of de functie van de trilharen negatief beïnvloeden en zelfs onherroepelijk beschadigen. Allergie beïnvloedt trilharen door het vrijzetten of aanmaken van ciliotoxische stoffen zoals MBP en ECP, maar ook cytokines (onder andere IL-1 en IL-13). Verdere studies zullen meer duidelijkheid geven over eventuele andere factoren die de functie van de trilharen kunnen beïnvloeden.

Referenties

1. Jorissen M. Correlations among mucociliary transport, ciliary function, and ciliary structure. *Am J Rhinol* 1998;12:53-8.
2. Jorissen M, Bessems A. Influence of culture duration and

- ciliogenesis on the relationship between ciliary beat frequency and temperature in nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995;252:451-4.
3. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B, Verbeken E, De Boeck K. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta oto-rhino-laryngologica belg* 2000;54:343-56.
 4. Afzelius BA. Ciliary structure in health and disease. *Acta oto-rhino-laryngologica belg* 2000;54:287-91.
 5. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B. Ciliary function analysis for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: advantages of ciliogenesis in culture. *Acta Otolaryngol* 2000;120:291-5.
 6. Jorissen M, Willems T, De Boeck K. Diagnostic evaluation of mucociliary transport: from symptoms to coordinated ciliary activity after ciliogenesis in culture. *Am J Rhinol* 2000;14:345-52.
 7. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B, Verbeken E. Secondary ciliary dyskinesia is absent after ciliogenesis in culture. *Acta oto-rhino-laryngologica belg* 2000;54:333-42.
 8. Wodehouse T, Kharitonov SA, Mackay IS, Barnes PJ, Wilson R, Cole P. Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia. *Eur Resp J* 2003;21:43-7.
 9. Carson JL, Collier AM, Hu SS. Acquired ciliary defects in nasal epithelium of children with acute viral upper respiratory infections. *N Engl J Med* 1985;312:463-8.
 10. Fujihara K, Yamanaka N, Bernstein JM, Ogra PL, Hard R. Morphologic and motility changes of nasal cilia in primary culture caused by *Haemophilus influenzae*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:452-7.
 11. Carson JL, Collier AM, Clyde WA Jr. Ciliary membrane alterations occurring in experimental *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Science* 1979;206:349-51.
 12. Amitani R, Wilson R, Rutman A, Read R, Ward C, Burnett D, Stockley RA, Cole PJ. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:26-32.
 13. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Sisson JH. TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *Am J Physiol* 1995;268:L911-917.
 14. Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O, et al. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 2001;108:1817-24.
 15. Berkman N, Robichaud A, Robbins RA, Roesems G, Haddad EB, Barnes PJ, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. *Immunology* 1996;89:363-7.
 16. Chapelin C, Coste A, Gilain L, Poron F, Verra F, Escudier E. Modified epithelial cell distribution in chronic airways inflammation. *Eur Respir J* 1996;9:2474-8.
 17. Al-Rawi MM, Edelstein DR, Erlandson RA. Changes in nasal epithelium in patients with severe chronic sinusitis: a clinicopathologic and electron microscopic study. *Laryngoscope* 1998;108:1816-23.
 18. Agu RU, Jorissen M, Willems T, Van den Mooter G, Kinget R, Augustijns P. Effects of pharmaceutical compounds on ciliary beating in human nasal epithelial cells: a comparative study of cell culture models. *Pharm Res* 1999;16:1380-5.
 19. Berg OH, Lie K, Steinsvag SK. The effect of decongestive nosedrops on human respiratory mucosa in vitro. *Laryngoscope* 1994;104:1153-8.
 20. Braat JP, Ainge G, Bowles JA, Richards DH, Van Riessen D, Visser WJ, et al. The lack of effect of benzalkonium chloride on the cilia of the nasal mucosa in patients with perennial allergic rhinitis: a combined functional, light, scanning and transmission electron microscopy study. *Clin Exp Allergy* 1995;25:957-65.
 21. Agu RU, Jorissen M, Willems T, Van den Mooter G, Kinget R, Verbeke N, et al. Safety assessment of selected cyclodextrins - effect on ciliary activity using a human cell suspension culture model exhibiting in vitro ciliogenesis. *Int J Pharm* 2000;193:219-26.
 22. Bertrand B, Collet S, Eloy P, Rombaux P. Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract. *Acta Oto-Rhino-Laryngol Belg* 2000;54:309-16. ■

Correspondentieadres auteurs:

Prof. dr. M. Jorissen

Ing. T. Willems

Dienst Neus-, Keel- en Oren, Gelaat- en Halschirurgie

UZ Sint Rafaël

Kapucijnenvoer 33

B-3000 Leuven

België

Tel: +32-16-332343

Fax: +32-16-332335

E-mail: Mark.Jorissen@uz.kuleuven.ac.be

Correspondentie gaarne richten aan eerste auteur

Financiële vergoeding: geen gemeld

Belangenconflict: geen gemeld