



MİKROBİYOTANIN ENFEKSİYON HASTALIKLARINDAKİ ROLÜ

Hamide KAYA^{1*}, Eyyüp KAYA¹

¹Mersin University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, 33110, Mersin, Türkiye

Özet: Gastrointestinal sistemde trilyonlarca mikroptan oluşan bağırsak mikrobiyotası, insan vücudundaki en büyük mikrobiyal topluluktur. Mikrobiyotanın sağlık ve hastalıklardaki rolü, keşfinden beri çok sayıda çalışmada vurgulanmaktadır. Mikrobiyota, bulunduğu bölgeye bağlı olarak bağırsak, ağız, solunum ve deri mikrobiyotası olarak sınıflandırılmaktadır. Mikrobiyal topluluklar, konakçı ile simbiyoz halinde olup, besinlerin emilimi, homeostaziye katkı, bağışıklık fonksiyonunun modülasyonu ve vücudu patojenik mikroorganizmalara karşı koruma gibi birçok fizyolojik işlevi yerine getirmektedir. Bununla birlikte, mikrobiyota disbiyozu, vücut fonksiyonlarında düzensizliğe ve kardiyovasküler hastalıklar, kanserler, solunum yolu hastalıkları gibi birçok hastalığa yol açabilmektedir. Çok sayıda araştırma, bağırsak mikrobiyotası ile bağırsaklar, akciğerler, beyin ve cilt gibi birçok organ arasında çift yönlü bir etkileşim olduğunu göstermiştir. Bağırsak mikrobiyal değişikliği birçok lokal ve sistemik bozukluğunun patogenezinde rol oynamaktadır. Bu nedenle, klinik olarak bağırsak mikrobiyal simbiyoz/disbiyoz mekanizmalarının anlaşılması önem arz etmektedir. Bu derleme mikrobiyotanın enfeksiyon hastalıklarındaki rolünü araştırma amacıyla yazılmıştır.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyota, Disbiyoz, Fekal mikrobiyota transplantasyonu, *C. difficile*, HIV


The Role of Microbiota in Infectious Diseases

Abstract: The gut microbiota, made up of trillions of microbes in the gastrointestinal tract, is the largest microbial community in the human body. The role of microbiota in health and disease has been emphasized in numerous studies since its discovery. Microbiota is classified as intestinal, oral, respiratory and skin microbiota depending on the region. Microbial communities are in symbiosis with the host and perform many physiological functions such as absorption of nutrients, contribution to homeostasis, modulation of immune function, and protection of the body against pathogenic microorganisms. However, microbiota dysbiosis can lead to irregularity in body functions and many diseases such as cardiovascular diseases, cancers, and respiratory diseases. Numerous studies have demonstrated a bidirectional interaction between the gut microbiota and many organs such as the gut, lungs, brain, and skin. Intestinal microbial changes play a role in the pathogenesis of many local and systemic disorders. Therefore, it is important to understand the mechanisms of intestinal microbial symbiosis/dysbiosis clinically. This review was written to investigate the role of microbiota in infectious diseases.

Keywords: Microbiota, Dysbiosis, Fecal Microbiota Transplantation, *C. difficile*, HIV

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Mersin University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, 33110, Mersin, Türkiye

E mail: hamidekirac@gmail.com (H. KAYA)

Hamide KAYA  <https://orcid.org/0000-0002-2956-8762>

Eyyüp KAYA  <https://orcid.org/0000-0001-9328-0088>

Gönderi: 03 Mayıs 2023

Received: May 03, 2023

Kabul: 01 Haziran 2023

Accepted: June 01, 2023

Yayınlanma: 01 Temmuz 2023

Published: July 01, 2023

Cite as: Kaya H, Kaya E. 2023. The role of microbiota in infectious diseases. BSJ Health Sci, 6(3): 516-519.

1. Giriş

Son yıllarda genomik, metagenomik ve metabolomik gelişmeler sayesinde mikrobiyal tedaviler gelişmiştir. Dolayısıyla, mikrobiyomun modülasyonu, birçok hastalık için potansiyel bir tedavi veya profilaksi olarak önerilmiştir. İnsan vücudu, bakterilerin büyük rol oynadığı virüsler, parazitler ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmaları barındırır (Ryan ve ark., 2021). Bu mikrobiyal topluluklar deri, üst solunum yolları, bağırsak ve genital yollar gibi birçok alanda bulunan insan mikrobiyotasını oluşturur (Lloyd-Price ve ark., 2016). Bağırsak florası, besin emilimi (Ellis, 2021), bağışıklık sisteminin modülasyonu (Bosco ve Noti, 2021) ve patojenik mikroorganizmalara karşı savunma (Schären ve Hapfelmeier, 2021) dahil olmak üzere çeşitli işlevlerde bir rol oynar. Mikrobiyotanın çeşitliliği ve yoğunluğu bulunduğu bölge boyunca değişkenlik göstermekle birlikte; ilaçlar, diyet, sağlık durumu, hijyen ve çevresel

mikroorganizmalar gibi farklı ekzo ve endojen faktörler tarafından kolaylıkla değiştirilebilir (Anvar ve ark., 2021). Bağırsak mikrobiyotası disbiyozu birçok sistemik metabolik hastalık (Wu ve ark., 2021) ve nörolojik bozuklukta (Salami, 2021) rol oynamaktadır. İnsan sindirim sisteminde, çoğu konakçı ile simbiyotik bir ilişki içinde yaşayan trilyonlarca mikroorganizma kolonize olmaktadır. Konakta mikrobiyal popülasyonların toplanmasına mikrobiyota denir. Mikrobiyotanın temel işlevi, konakçı bağışıklık tepkilerinin modülasyonunu içeren çeşitli mekanizmalarla, ekzojen patojenler ve potansiyel olarak zararlı yerli mikroorganizmalar tarafından kolonizasyona karşı bağırsağı korumaktır. Normal mikrobiyal topluluğun parçalanması, patojen enfeksiyon riskini ve inflamatuvar hastalık riskini artırır. Mikrobiyotanın patojenler ve konakçı ile etkileşimini anlamak, enfeksiyon hastalıklarının patogenezine yeni bakış açısı oluşturmanın yanı sıra bağırsak ve sistemik bozuklukların önlenmesi ve tedavisi için yeni yollar



sağlayabilir (Kamada ve ark., 2013).

Mikrobiyota enfeksiyon hastalıklarının oluşmasında ve hastalıkların seyrinde önemli bir yer tutar. Bu derlemenin amacı, mikrobiyotanın enfeksiyon hastalıkları gelişimi ve progresyonundaki rolünü vurgulamaktır.

2. Bağırsak Mikrobiyotası

İnsanlarda gastrointestinal sistem mikrobiyotasında çoğunluğu anaerob olmak üzere 35000'den fazla türde bakteri yer almaktadır. Ancak mikrobiyota çalışmalarında 400 bakteri türü tespit edilebilmiştir (Uygun, 2017). Avrupalı bireylerin dışkılarının metagenomik analizi ile mikrobiyal genlerin %99'undan fazlasının bakteriyel olduğu ve dışkının 1000-1150 bakteri türü barındırdığı vurgulanmaktadır (Qin ve ark., 2010).

Bacteroides ve *Firmicutes* başta olmak üzere *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaeta* ve *Cyanobacteria*'lar intestinal sistemde flora elemanı olarak bulunmaktadır. Mikrobiyota dengesi dinamiktir. Günlük olarak beslenme ile değişkenlik gösterse de yaşlanma, ilaç kullanımı gibi sebeplerle kalıcı değişiklikler de görülebilmektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı, irritable bağırsak sendromu gibi gastrointestinal sistem kaynaklı hastalıkların yanı sıra astım, atopi, otoimmün bozukluklar, metabolik sendrom, hiperkolesterolemi gibi diğer sistemik hastalıklar da mikrobiyota dengesini bozabilmektedir (Uygun, 2017). Mikrobiyal dağılımda, özefagustan rektuma bireyin tüm yaşamı boyunca zamansal ve mekansal farklılıklar vardır. Genom dizileme teknolojilerindeki ve biyoinformatikteki gelişmeler, artık bilim adamlarının bu mikroorganizmaları, işlevlerini ve konak-mikrop etkileşimlerini hem sağlıkta hem de hastalıkta ayrıntılı bir şekilde incelemelerini sağlamıştır. Normal bağırsak mikrobiyotasının, konakçı besin metabolizmasında, ksenobiyotik ve ilaç metabolizmasında, bağırsak mukozal bariyerinin yapısal bütünlüğünün korunmasında, immünomodülasyonda ve patojenlere karşı korumada spesifik işlevleri vardır. Yapılan mikrobiyotanın şekillenmesinde doğum şekli (sezeryan veya vajinal doğum), diyet, probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik kullanımı, anne sütü alımının etkili olduğu bulunmuştur. Özellikle *Bifidobacterium* kullanımında sezaryenle doğan yenidoğanlarda, vajinal yolla doğan yenidoğanlardakine yakın, faydalı bağırsak mikrobiyotası kolonizasyonu olduğu bildirilmiştir. Anne sütü ile beslenen yenidoğanların faydalı bağırsak mikrobiyotası daha belirgindir. Bu etki emzirilen bebeklerde daha belirgindir. Mikrobiyotanın şekillenmesinde antibiyotik kullanımı da rol oynar. Antibiyotik kullanımının oluşturduğu önemli bir endişe, normal sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının uzun vadeli değişimi ve çoklu ilaca dirençli gen havuzuna sahip organizmaların rezervuarı ile sonuçlanabilecek direnç genlerinin yatay transferidir (Jandhyala ve ark., 2015; Martín-Peláez ve ark., 2022).

3. Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu ve *Clostridioides difficile* Enfeksiyonlarının Tedavisindeki Yeri

İlk kez 1958 yılında Eiseman ve meslektaşları tarafından *C. difficile* enfeksiyonuna bağlı gelişen psödomembranöz kolit tedavisi için FMT uygulanmıştır (Gupta ve ark., 2016). Fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT), tamamen sağlıklı olduğu belirlenen bireylerden alınan gaitanın işlenerek, suspansiyon halinde sonda uygulamaları veya endoskopi/kolonoskopi ile hasta bireyin bağırsaklarına nakledilmesidir. Aslında, FMT (veya fekal bakteriyoterapi), başta *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) olmak üzere bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmedeki başarısından sonra (Kim ve Gluck, 2019) obezite ve diyabet gibi diğer bozuklukların tedavisinde de giderek ve hızla uygulanmaktadır (Napolitano ve Covasa, 2020). Mikrobiyota transplantasyonu artık, tekrarlayan *C. difficile* ile indüklenen kolitin tedavisi için etkili bir terapötik yöntem olarak kabul edilmektedir (Nicco ve ark., 2020). *Clostridioides difficile* enfeksiyonları (CDE) genellikle tekrarlayan antibiyotik kullanımı ile ilişkilidir ve ilk antibiyotik tedavisinden sonra hastaların %20-30'unda nüks görülmektedir. FMT'nun yüksek başarı oranı (%85-95) nedeniyle Avrupa ve Kuzey Amerikada tekrarlayan CDE'lerinde önerilmektedir (Reygner ve ark., 2020). Günümüzde, *C. difficile*'ye bağlı enfeksiyon dışındaki bağırsak hastalıklarının da bu uygulamadan fayda görebileceğinden, FMT tedavisine ilgi artmaktadır (Huttner ve ark., 2019).

Bağırsak mikrobiyotası ile CDE arasında güçlü bir ilişki olduğundan tedavi ve yönetim için terapötik bir seçenek olarak mikrobiyal modülasyonun kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Bu tür tedavilerin amacı, tekrarlayan enfeksiyonları önlemek için bağırsak mikrobiyotasını eski haline getirmektir (Khanna ve ark., 2020). FMT tedavisindeki amaç bozulmuş florayı onarmak ve sağlıklı floranın devamlılığını sağlayabilmektir.

Tekrarlayan CDE, hastanelerde ve uzun süreli bakım tesislerinde yaşlı erişkinlerde morbidite ve yaşam kalitesi üzerinde büyük etkisi olan yaygın bir hastane enfeksiyonudur. Antibiyotikler bu hastalığı tedavi etmede genellikle başarısız olduğundan, FMT tekrarlayan CDE tedavisinde ikinci basamak tedavi olarak ortaya çıkmıştır (Burke ve Lamont, 2013). Tedavi klavuzlarında persistan CDE için FMT tedavisi önerilmektedir (Demirci, 2019).

Şu anda, bağırsak disbiyozunu düzeltmek için çok çeşitli tıbbi terapötik stratejiler kullanılmaktadır. Ancak bunların büyük çoğunluğu FMT dışında tatmin edici klinik etkiler göstermemektedir. Birçok çalışma, FMT'nin, komorbid durumları olan veya bağışıklığı baskılanmış hastalarda bile tekrarlayan ve dirençli CDE için başarılı bir tedavi olduğunu kanıtlamıştır. CDE'deki uygulamanın ötesinde, son yıllarda FMT'nin daha yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir (Agrawal ve ark., 2016).

4. Mikrobiyota İle İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) Enfeksiyonu İlişkisi

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunda hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olarak kronik enflamasyonun kalıcı hale geldiği bilinmektedir. HIV enfeksiyonlarında CD4+ T hücre kaybı gelişmektedir. Bu hücrelerin kaybının önemli bir kısmı gastrointestinal sistem aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bağırsakta T helper-17 hücrelerinin azalması mukozal immünite ile ilişkilidir ve bakteriyel DNA ve lipopolisakkaritler gibi mikrobiyal ürünlerin translokasyonuna yol açmaktadır. Ayrıca nötrofiller gastrointestinal kanala sızarak mukozal bariyer hasarına neden olur. Mikrobiyal translokasyon HIV ile enfekte hastalarda, enflamasyona bağlı olarak mortalite ve morbiditenin önemli bir sebebidir (Bilgiç ve Kayaaslan, 2021). Ayrıca antiretroviral tedavi ile bağırsak mikrobiyotası arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir. Altmış bir HIV ile enfekte hasta ve 30 sağlıklı kontrol grubu ile yapılan bir çalışmada tüm katılımcıların bağırsak mikrobiyotası metagenomik dizileme ile incelenmiş ve HIV-1 ile enfekte bireylerde sağlıklı kontrol grubuna göre bağırsak mikrobiyotasının daha fazla *Prevotella* ve daha az *Bacteroides* türünü barındırdığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra antiretroviral tedaviye immünolojik yanıt vermeyen hasta grubunun mikrobiyotasında; tedaviye yanıt veren gruptaki hastalar göre *Faecalibacterium prausnitzii*, *Subdoligranulum* türleri ve *Coprococcus come* açısından daha zengin olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın sonuçları, HIV-1 ile enfekte kişilerde bağırsak mikrobiyota değişikliklerinin CD4+ T-hücre sayıları ve immün aktivasyon ile ilişkili olduğunu göstermiş ve bu sebeple de HIV-1'li hastalarda tedaviye yanıt ve hastalık progresyonu için bağırsak disbiyozunu düzenleyici protokollerin tedavide yeni bir strateji olabileceği vurgulanmıştır (Lu ve ark., 2018). HIV pozitif hastalarda mikrobiyata disbiyozu ile mikrobiyal translokasyon ve kronik enflamasyon birbiriyle ilişkilendirilmiş ve aralarında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Dinh ve ark., 2015).

CD4/CD8 oranı <1 olan antiretroviral tedavi alan HIV ile enfekte 29 hasta üzerinde FMT ile yapılmış bir çalışmada, plasebo grubuna kıyasla denek grubunda mikrobiyotanın anlamlı şekilde düzelmesi ve özellikle dördüncü haftadan sonra mortalite ile ilişkilendirilen, bağırsak hasarının bir biyobelirteci olan bağırsak yağ asidi bağlayıcı proteinde azalma tespit edilmiştir. FMT hem güvenilir olması hem de noninvaziv olması nedeniyle HIV ile enfekte hastalarda önerilmektedir (Serrano-Villar ve ark., 2021).

5. Sonuç

Birçok hastalığın patogenezi, teşhisi ve tedavisindeki önemi nedeniyle, bağırsak mikrobiyota çeşitliliği ve metabolitlerinin mekanik olarak anlaşılması giderek önem kazanmıştır. Mikrobiyotanın konağı neredeyse tüm yönleri ile etkileyebildiği, disbiyozun ise geniş bir hastalık spektrumu ile ilişkili olduğu artık doğrulanmıştır. Güncel çalışmalar, mikrobiyotanın insan sağlığını korumada ve patogeneizde önemli rol oynadığını vurgulamaktadır.

Ancak, mikrobiyota çalışmaları esas olarak bakteriyel bileşene odaklanmış olup; mantarların, virüslerin ve diğer mikropların rolü belirsizliğini korumaktadır. Ek olarak, hastalık durumlarında mikrobiyota disbiyozu sıklıkla gözlenirken, mikrobiyotanın nedensel rolü henüz belirlenmemiştir. Konak-mikrobiyota ilişkisinin daha iyi anlaşılması, FMT ve bakteri modülasyonu gibi mikrobiyota bazlı tedavilerin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır. Mikrobiyal simbiyotların manipülasyonu ile hastalıkları tedavi etmek ve sağlığı iyileştirmek için mikrobiyota disbiyozunu hedef alan incelikli ve güvenli stratejiler bulmaktan geçmektedir.

Katkı Oranı Beyanı

Yazar(lar)ın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Tüm yazarlar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	H.K.	E.K.
K	80	20
T	80	20
Y	80	20
KT	70	30
YZ	70	30
KI	90	10
GR	100	

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon.

Çalışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Kaynaklar

- Agrawal M, Aroniadis OC, Brandt LJ, Kelly C, Freeman S, Surawicz C, et al. 2016. The long-term efficacy and safety of fecal microbiota transplant for recurrent, severe, and complicated *Clostridium difficile* infection in 146 elderly individuals. *J Clin Gastroenterol*, 50(5): 403-407.
- Anwar H, Iftikhar A, Muzaffar H, Almatroudi A, Allemailem KS, Navaid S, et al. 2021. Biodiversity of gut microbiota: Impact of various host and environmental factors. *BioMed Res Inter*, 2021: 5575245.
- Bilgiç Z, Kayaaslan B. 2021. HIV ile yaşayan bireylerde kronik enflamasyon ve mikrobiyota ilişkisi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 74(1): 10-16.
- Bosco N, Noti M. 2021. The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes Immun*, 22(5-6): 289-303.
- Burke KE, Lamont JT. 2013. Fecal Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection in Older Adults: A Review. *J American Geriatr Soc*, 61(8): 1394-1398.
- Demirci H. 2019. Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu. *Tıp Fak Klin Derg*, 2(4): 127-129.
- Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, Bhalchandra S, Tai AK, Kane AV, et al. 2015. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J Infect Dis*, 211(1): 19-27.
- Ellis JL, Karl JP, Oliverio AM, Fu X, Soares JW, Wolfe BE, et al. 2021. Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes*, 13(1): 1887721.

- Gupta S, Allen-Vercoe E, Petrof EO. 2016. Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therap Adv Gastroenterol*, 9(2): 229-239.
- Huttner BD, De Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, et al. 2019. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: A randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*, 25(7): 830-838.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*, 21(29): 8787.
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Rev Immunol*, 13(5): 321-335.
- Khanna S, Pardi DS, Jones C, et al. 2020. RBX7455, a room temperature-stable, orally-administered investigational live biotherapeutic, is safe, effective, and shifts patients' microbiomes in a phase 1 study for recurrent Clostridioides difficile infections. *Clin Infect Dis*, 73(7): e1613-e1620.
- Kim KO, Gluck M. 2019. Fecal microbiota transplantation: an update on clinical practice. *Clin Endoscop*, 52(2): 137-143.
- Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome Med*, 8(1):1-11.
- Lu W, Feng Y, Jing F, Han Y, Lyu N, Liu F, et al. 2018. Association between gut microbiota and CD4 recovery in HIV-1 infected patients. *Front Microb*, 9: 1451.
- Martín-Peláez S, Cano-Ibáñez N, Pinto-Gallardo M, Amezcua-Prieto C. (2022). The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics during pregnancy or lactation on the intestinal microbiota of children born by cesarean section: A systematic review. *Nutrients*, 14(2): 341.
- Napolitano M, Covasa M. 2020. Microbiota transplant in the treatment of obesity and diabetes: current and future perspectives. *Front Microbiol*, 11: 590370.
- Nicco C, Paule A, Konturek P, Edeas M. 2020. From donor to patient: collection, preparation and cryopreservation of fecal samples for fecal microbiota transplantation. *Diseases*, 8(2): 9.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Wang J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285): 59-65.
- Reygner J, Charrueau C, Delannoy J, Mayeur C, Robert V, Cuinat C, Kapel N. 2020. Freeze-dried fecal samples are biologically active after long-lasting storage and suited to fecal microbiota transplantation in a preclinical murine model of Clostridioides difficile infection. *Gut Microbes*, 11(5): 1405-1422.
- Ryan MJ, Schloter M, Berg G, Kostic T, Kinkel LL, Eversole K, et al. 2021. Development of microbiome biobanks—challenges and opportunities: (Trends in Microbiology 29, 89–92; 2021). *Trends Microbiol*, 29(4): 378.
- Salami M. 2021. Interplay of good bacteria and central nervous system: cognitive aspects and mechanistic considerations. *Front Neurosci*, 25.
- Schären OP, Hapfelmeier S. 2021. Robust microbe immune recognition in the intestinal mucosa. *Genes Immun*, 22(5-6): 268-275.
- Serrano-Villar S, Talavera-Rodríguez A, José Gosalbes M, Madrid N, Pérez-Molina JA, Elliott RJ, et al. 2021. Fecal microbiota transplantation in HIV: A pilot placebo-controlled study. *Nature Communicat*, 12(1): 1-13.
- Uygun A. 2017. Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu (FMT). *J Biotechnol Strat Health Res*, 1: 132-140.
- Wu J, Wang K, Wang X, Pang Y, Jiang C. 2021. The role of the gut microbiome and its metabolites in metabolic diseases. *Protein Cell*, 12: 360-373.