

Bakteriyel İnfeksiyonlara Karşı İmmünite

Işık Yalçın

Mikroorganizmalarla dolu bir dünyada yaşayan insan çeşitli bakteri, fungus, virus ve parazitlerle karşı karşıya gelmektedir. İnsan vücudu, tüm orifisler ve gastrointestinal sistemde zengin bir doğal flora sahiptir. Sindirim işinde bile gastrointestinal flora rol almaktadır. İnsan vücudu çok kapsamlı anlaşılması güç bir mekanizma ile patojen mikroorganizmaları ortadan kaldırmaya çalışmaktadır. Anatomik bariyerler, fagositik hücreler ve kompleman hep birlikte koruyucu görev yaparlar.

İnfeksiyonlara karşı konak savunması lokal, sistemik, nonspesifik, spesifik, hümmoral ve selüler olabilir (2, 4).

Vücut Yüzeylerinde Konak Savunması

Vücuttan Mikroorganizmaların Atılması

Solunum yollarının mukosilyar yapısı mikroorganizmayı ve yabancı maddeleri orofarinkse getirir. Orofarinksten öksürük ile dışarıya, yutularak da barsaklarla dışarıya atılır. Epitelyal deskuamasyonla bir çok aderan mikroorganizmalar atılır. Defekasyonla günde 10^{12} bakteri ve üriner akımla uretral epitele kolonize olan mikroorganizmalar elimine olur.

Gözyaşı, tükürük ve hapsürma birçok mikroorganizmaları dışarı atar.

Antimikrobiyal Faktörlerin Oluşumu

Lizozim (muramidaz), katyonik düşük moleküler ağırlıklı bir enzimdir. Bakterilerin hücre duvarlarındaki mukopeptidlerine etki gösterir ve bakterilerin lokal konsantrasyonlarını azaltır. Gözyaşı, tükürük ve nazal sekresyonlarda bulunur. Tükürük glikolipidleri kariojenik bakterilerin oral epitel hücrelerine tutunmasını önler. Tükürük ve sütte bulunan laktoperoksidazın SCH-H₂O₂ sisteminde in vitro olarak antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır. Etki mekanizması da miyeloperoksidazlara benzemektedir.

Gastrik asidite *Salmonella* türlerinin, *Vibrio cholerae*'nin barsaklara geçişini önler. Aklorhidria, gastrik rezeksiyonlar salmonelloz, kolera ve giardiazise eğilimi artırır. Bikarbonat verilerek gastrik nötralizasyon yapılan volenterlerde kolera ve şigelozise eğilim artmıştır. Deri ve vajinal sekresyonların asiditesi patojenlerin kolonizasyonunu azaltır. Prostatik sekresyonlarda bulunan spermin (bir poliamin) Gram-pozitif mikroorganizmaların bir inhibitördür. Seminal plazma da kuvvetli bir bakterisidal etki gösterir. Bu etki çinkonun varlığı ile ilgili olabilir.

Bakteriyel İnterferans

Vücut yüzeyindeki normal flora konağın yalnızca doğal

antikor yapımını stimüle etmekle kalmaz, ayrıca konağın savunma fonksiyonlarında da rol oynar. Örneğin derideki *Propionibacterium acne*; *Staphylococcus aureus*'un kolonizasyonunu azaltır. *Streptococcus pyogenes* ise antibakteriyel etki gösteren deri lipidlerinin yapımını sağlar.

Eksperimental koşullarda derinin asetonla temizlenmesi patojen kokların çoğalmasına yardım eder. Barsaktaki anaerob bakteriler yağ asitleri oluşturarak *Salmonella*'ların lokal gelişmesini engeller. Selektif olarak anaeroblara ortadan kaldıran antibiyotikler indirekt olarak *Salmonella*'lara eğilimi arttırır.

Kahçı barsak florası lokal olarak pH etkileri ile ve yağ asitleri yaparak *Shigella*'ların çoğalmasını önlerler. Barsak anaeroblara tarafından dekonjüge edilen safra asitleri de *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacilli* ve *Enterococci*'yi inhibe eder.

Farinksde bulunan viridans streptokok, pnömokok ve *Staphylococcus epidermidis*'in çoğalmasını engeller.

Epitelyal Hücrelere Tutunma ve Penetrasyon

Bütünlüğü tam olan deri nadiren infekte olur. Birçok patojen için infeksiyonda ilk adım epitelyal yüzeye tutunmadır. Tutunma yeteneği virulans ile ilgilidir. Mikroorganizma epitelyal hücrelere ulaşmadan önce mukus veya tükürük bariyerini geçmesi gerekmektedir. Bu sekresyonlardaki materyaller, epitelyal hücrelere tutunmayı önler. Diyet de epitelyal hücre kolonizasyonunu önleyebilir. Etli bir diyet bakteriyel adezyon için reseptör içerebilir. Bitki ve hayvanlardan elde edilen konkonavalin A gibi karbonhidrat bağliyan proteinler (Lektin) *Lactobacilli* ve *E. coli*'nin mukoza hücrelerine yapışmasını önleyebilir.

Epitelyal Hücrelere Tutunmanın Mekanizması

Epitel hücrelerine tutunma; bir taraftan bağlanma yerindeki mikrobiyal yüzey faktörlerine diğer taraftan epitel hücrelerindeki reseptör yerlerine bağlıdır. Birçok kanıtlar memelilerdeki reseptör bölgelerinin mannoz, fruktoz ve galaktoz gibi şekerden oluştuğunu göstermektedir. Bu yapı bir çok bakterinin epitel hücrelerine tutunmasını önleyebilir.

Epitelyal hücre reseptörlerinin kesin yapısı ve lokalizasyonu bilinmemektedir. Bakteri şeker reseptörlerine lektine benzer bağlanma yerleri (adezinler) ile tutunur. Adezinler proteinöz, saç benzer fimbria formunu alır. Gonokokların mukoza yüzeyine ve uretraya tutunmaları fimbrialara bağlı gibi görünmektedir. Bu durum olmasaydı gonokoklar üriner akımla atılırlardı. Üriner sistem infeksiyonlarında rol oynayan Gram-negatif çomaklar da benzer yapıyı gösterirler. *E. coli*, *Salmonella*'lar, *Vibrio*'ların intestinal epitele tutunmaları ve diare patogeneğinde fimbriae önemli olmaktadır. Domuzlarda toksin oluşturan *E. coli*, K 88 antijeni taşımadıkça diare gelişmemektedir.

K 88 antijeni bakteri yüzeyinde fimbriae şeklinde dağılırsa bakteri epitel yüzeyine tutunmakta ve mannoza dirençli epitel hücre reseptörüne bakterinin tutunmasını sağlamakta-

İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları, Klinik İmmünoloji ve Allerji Bilim Dalı, Çapa - İstanbul
İnfeksiyonlara karşı İmmünite Simpözyumu'nda (13 Ocak 1988, İstanbul) bildirilmiştir.

dir. *S. pyogenes*'in epitel hücrelerine tutunması ise lipoteikoik asid aracılığı ile olmaktadır. Lipoteikoik asid M proteini boyunca yüzeydeki fimbriæ'de lokalizedir.

Streptococcus mutans ağızda bulunan ve diş çürütmesine neden olan önemli bir etkidir. Bu etken sukrozdan gluklan sentez ederek bakterilerin birbirlerine ve dental yüzeylere yapışmasını sağlar.

Epitel Hücre Penetrasyonunun Önemi

M. pneumoniae, *C. diphtheriae*, *B. pertussis*, *V. cholerae* ve enterotoksijenik *E. coli*'ler epitele penetre olmadan epitel yüzeyinde kalırlar. Diğer bazı patojenler ise epitel hücrelerinin içine girerek penetre olurlar. Buna örnek kolonu infekte eden *Shigella* türleri gösterilebilir. Epitelyal hücre invazyonu döneminde durdurulamayan patojenler ise sistemik yayılma gösterirler. Bu patern salmonellozis için tipiktir.

Bir çok patojenler için epitel hücre invazyonu önemlidir. Protozoa, spiroket, funguslar, *L. monocytogenes* ve *N. gonorrhoeae* buna örnek gösterilebilir. Intraepitelyal hücre lokalizasyonu gösteren patojenler antikorlardan, antibiyotiklerden, polimorfonükleer ve mononükleer fagositlerin yutma ve öldürme fonksiyonlarından korunurlar.

Epitelyal hücre penetrasyonu bir çok yönleri ile fagositoza benzer şekilde endositoz süreci ile ilgili gibi görünmektedir. Epitel hücrelerinin invazyon yapan patojenlere karşı misafirperverliğini sağlayan faktörlerin ne olduğu bilinmemektedir.

Mikroorganizmaların Epitelyal Hücre Tutunmasına Karşı Konak Savunması

Konak patojenlerin epitel hücrelerine tutunmasını normal mikrobiyal flora ile kısmen önlemeye çalışır. Bu flora mukoza yüzeyindeki tutunmayı sağlayan reseptör bölgelerini kaplıyarak iş görür. Yüksek moleküler ağırlıklı bir protein olan fibronektin orofaringeal epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunur. Bakterinin epitelyal hücre reseptörlerin örterek tutunmasını önler. Glikoprotein ve pH gibi lokal faktörlerde tutunmayı önler.

Mukoza yüzeyindeki antikorlarda mukozal invazyonun önlenmesinde önemli rol oynar. Mukoza yüzeyindeki antikor yanında salgısal IgA önemli bir görev yapar. Salgısal IgA lokal olarak mukozadaki plazma hücrelerinde sentez edilir. Sekretuar komponent de mukozadaki epitelyal hücrelerde salgılanmaktadır. Salgısal IgA antijen bağlar, virus ve bakteriyel enterotoksini nötralize eder. Bakterilerin mukozaya tutunmasını önler. Salgısal IgA demir bağlayan bir protein olan ve salgılarda bol bulunan laktoferinin bakteriyostatik etkisini artırır.

Eksperimental koşullarda IgA oral streptokok ve *V. Cholerae*'nin mukoza yüzeyine tutunmasını önler. Salgısal IgA *N. gonorrhoeae* gibi bir çok mikroorganizmanın kolonizasyonunu azaltır. Ancak IgA varlığına rağmen bazı bakterilerin mukozadaki epitelyal hücrelere tutunduğu görülmektedir. Dental plak formasyonu yapan *Streptococcus sanguis* ve *Streptococcus mitior*, *Streptococcus pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* ve *H. influenzae*'nin IgA'yı parçalayan ve inaktif eden IgA proteaz oluşturdukları gösterilmiştir. IgA₂, IgA₁ proteaza dirençlidir. *Bacteroides melaninogenicus* ve *Caphocytophaga* yalnızca IgA₁ değil, IgA₂ ve IgG'yi de parçalama yeteneğindedir. Bu bakteriler insanlardaki periodontal hastalıklar da önemli etken olarak karşımıza çıkmaktadır. İmmunoglobulin proteaz aktivitesi insanlardaki

orofaringeal sekresyonlarda, dental plak ve vajinal sekresyonlarda da gösterilmiştir. Bu cins proteazların bakteri ve epitelyal hücrelerin interaksiyonunda önemli rol oynadığı olasıdır (1, 2).

İnfeksiyonlara Karşı Sistematik İmmünite

Mikroorganizmalar lokal savunma mekanizmasını aştıklarında 2 tip fagositik hücre aktivitesi ile karşılaşılır: Polimorfonükleer ve mononükleer fagositler. Bu hücrelere profesyonel fagositler denilmektedir. Membranlarında IgG'nin Fc bölümü (IgG₁ ve IgG₃ alt grupları) için ve aktive C₃ için reseptör taşırlar. Bu reseptörler fagositozu arttırlar. Profesyonel olmayan fakültatif fagositlerin (endotel, epitel hücreleri, fibroblastlar) IgG veya C₃ için reseptörleri yoktur.

Polimorfonükleer Nötrofil Lökositler

Bu hücreler mikroorganizmaların destrüksiyonu ile ilgilidir.

Mononükleer Fagositler

Bu hücreler monosit ve makrofajlardır. Monositler olgun doku makrofajlarının immatür formlarıdır. Monositler akut infeksiyonlarda nötrofillere yardım ederler. Nötrofillere göre fagositozda daha az etkilidirler. Bakterisidal etkileride zayıftır. Kronik infeksiyonlarda makrofajlar çok daha etkilidir.

Duyarlaşmış lenfositler makrofajların bakterisidal etkilerini arttırlar. Bu etkiyi ya hücreden hücreye direkt temasta yada lenfokinler yoluyla yaparlar. Makrofajlar inkeste veya absorbe ettikleri antijeni işleme koyar ve lenfositleri duyarlaştırmak için hazırlarlar.

M. leprae, *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhi*, bazı virus ve protozoonlar lenfosit ve makrofajların kontrolü altında tutulur (1, 2, 3, 4).

Sistemik İmmünitenin Hümorale Sistemleri

Sistemik infeksiyonda hümorale faktörlerin rolü; kemo-taksi opsoninleşme gibi fagositik fonksiyonların artışıyla ilgilidir.

Kompleman Aracılığı İle Gelişen Bakteriyolizis

Spesifik antikorun varlığında intak bir klasik kompleman peveyi Gram-negatif bakterileri doğrudan doğruya eritir. Buna örnek *N. gonorrhoeae*, *N. meningitis*, *H. influenzae*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Vibrio* gösterilebilir. Gram-negatif bakterilerin endotoksinleri ise diğer membran yapıtları ile bloke edilmedikçe direkt olarak alternatif kompleman yolunu aktive eder ve böylece antikor yokluğunda da bakteriyolizis olur. Böylece immün olmayan konakta alternatif kompleman yolu savunmada ilk sırada iş yapar. Kompleman aktivasyonu bütün olarak tamamladığında bakteriyolizis olmaktadır.

Terminal komponentlerden C₆, C₇, C₈ eksikliğinde gonokokal veya meningokokal sepsis tekrarlamaktadır. Hücre duvarı materyelini kaybeden L formundaki bakteriyal varyantlarda komplemanın neden olduğu lizise uğralar.

Viral Nötralizasyon

Hümorale antikorla sağlanan önemli bir fonksiyon viral nötralizasyondur.

Betalizin

Oldukça reaktif, ısıya dayanıklı katyonik bir proteindir. Streptokok dışında Gram-pozitif mikroorganizmalara karşı bakterisidal etki gösterir. Koagülasyon esnasında trombositlerden salınan bir maddedir.

D. Lizozim

Bazik bir proteindir. Kaynağını fagositik hücrelerden alır. Serumdaki konsantrasyonu 1-2 mg/ml'dir. Monosit ve makrofajlardan aktif olarak salınır.

Sirkülasyona karışan bakteriler, mononükleer fagositer sistemin sabit doku makrofajları, özellikle karaciğerdeki kupffer hücreleri tarafından temizlenir (2).

Mononükleer Fagositik Sistem ve Fonksiyonları

Kemik iliğinden orjine eder. Ara dönemdeki hücreler monositlerdir. Bu hücrelere sirkülasyonda rastlanır. Monositler ölmez, sirkülasyonu terkettilerinde dokuda matür makrofaj haline (histiyosit) geçerler. Makrofajlar akciğer ve karaciğerde lokal olarak proliferer olurlar. Hücrenin yüzeyinde IgG için Fc reseptörü taşırlar.

Kemotaksi

Mononükleer fagositlerin kemotaksisinde rol oynayan humoral mediatörler nötrofillere göre daha az bilinir. C_{5a} serumda kemotaktik aktivite gösterir. Duyarlaşmış lenfositleri toplar. Aynı şekilde duyarlaşmış lenfositlerden salınan MIF'de inflamasyon bölgesine çekilmiş fagositik hücreleri orada tutan bir etki gösterir.

Oponizasyon

Serum opsoninlerinin fonksiyonları mikroorganizmalarla reaksiyona girerek onları fagositler tarafından yutulmaya hazırlar. "Opsonein" kelimesinin Yunanca anlamı, yemek için hazırlamaktır. Bir çok patojenlerin virulansı çeşitli yüzey antijenleri ile fagositozu ortadan kaldırma yetenekleriyle ilgilidir. Antifagositik yüzey faktörleri içeren mikroorganizmalar şunlardır: *S. pneumoniae*, *B. grubu streptokoklar*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *B. fragilis* ve *P. aeruginosa*'nın bazı suşları, (kapsüller polisakkaridaz), *B. anthracis* (kapsüller polipeptid), *N. gonorrhoeae*, *S. pyogenes* (kapsüller hiyaluronik asid ve M protein), *S. aureus* (IgG'nin Fc bölümünü bağlayan protein A).

Van Oss, virulan olmayan bakterinin fagositozu uygun kılan hidrofobik yüzeye; virulan bakterinin ise özellikle an-kapsüller mikroorganizmaların fagositozunu azaltan hidrofilik yüzey faktörlerine sahip olduğu ileri sürmüştür. Bu görüşe göre opsonizasyonun amacı hidrofobisiteyi artırmaktır.

Oponizasyon 3 mekanizmadan biri ile olur. 1. spesifik antikor (IgG₁, IgG₃) tek başına opsonin olarak iş görebilir. Pnömonokok yüzey polisakkarid antijenleri ile antikapsüller antikorlar bağlar ve antikor molekülünün Fc bölümü serbestleşerek fagositin yüzeyindeki Fc reseptörüne bağlanır ve bakteri-fagosit arasındaki köprüleşme tamamlanır. C₁, C₄, C₂ spesifik antikor (IgM, IgG) klasik kompleman yolunu C₁, C₄, C₂ üzerinden etkiler ve bu opsonizasyonu artırır. C₃ fragmanları için (C_{3b}, C₃₆₁) fagosit yüzeyinde reseptör vardır. Aktive olan C₃ bakteri yüzeyi ve fagosit arasında köprü olarak iş yapar. 3. tip opsonizasyon nonspesifik olarak alter-

natif kompleman yoluyla olabilir. Alternatif yol antijen antikor interaksiyonunu gerektirmez. Bu yol doğrudan doğruya bakteriyel veya fungal polisakkaridlerle aktive olmaktadır ve C₃ fiksasyonu ile sonuçlanır. Fagositlerle gerçekleşen injeksiyon aktive C₃ için selüler reseptörler ile olmaktadır.

İnsanlarda görülen infeksiyonlarda alternatif kompleman yolunun rolü iyi bilinmemektedir. Orak hücreli anemisi olan kişilerin ağır pnömonokok infeksiyonlarına eğilimi bu hastaların düşük seviyedeki ısıya labil pnömonokok opsoninleri ile ilgili olabilir. Bu hastalar alternatif kompleman yolunu tam olarak aktive edemezler, belki de dalakta sentez edilen kompleman komponentlerinin eksikliği söz konusu olabilir. Her ne kadar bu hastalarda faktör B ve properdin normal olmasına rağmen C₃ proaktivatör konvertaz (C₃ PA) yetersiz olabilir (2).

Fagositozu Arttıran Diğer Faktörler

1- *Yüzey Fagositozu*: Birçok mikrobiyal patojen antifagositik yüzey komponentlerine sahiptir. Pnömonokokal polisakkarid antijenleri gibi antifagositik yüzey komponentleri spesifik antikorun yokluğunda fagositozdan korunurlar. Bu süre hastalığın 5-6 gününe kadar devam eder. Ankapsüle bakteriler, lökositler arasında lökosit ve doku arasında tutulurlar. Yüzey fagositozu hem mononükleer fagositler hem de nötrofiller tarafından yapılmaktadır. Plevra, perikard, eklem sıvısı ve BOS gibi yerlerde lökositler sıkışmadan daha seyrek buldukları için bu yerlerde yüzey fagositozu daha az etkilidir.

2- *Doğal Antikorlar*: Spesifik antijenin yokluğunda serumda saptanan antikorlara doğal antikor denir. Doğal antikorlar büyük bir olasılıkla benzer yapıdaki mikrobiyal antijenler ile karşılaşmayı yansıtır. Örneğin 1 yaşın üzerindeki kişilerde % 80 oranında tip 7 pnömonokok antikorları vardır. Oysa bu etkenin taşıyıcılığı % 1 oranındadır. Doğal antikorlar ısıya labil opsonin sistemine de katılırlar.

3- *Tuftsın*: Polimorfonükleer lökosit kaplayan ve globulin yapısında bir lökokinin olan tuftsın nötrofillerin fagositozunu stimüle eder.

Mononükleer fagositlerin ve makrofajların da IgG₁, IgG₃ ve C₃ için reseptörleri vardır.

Yutulma

Monositler bakterileri lökositlerden daha yavaş yutar. Daha etkisiz bir şekilde öldürür, öldürme işleminde ise daha çok oksijene bağımlı metabolik yolu kullanır.

Öldürme

Monosit matürasyonunun erken döneminde myeloperoksidaz, arilsulfataz ve asid fosfataz saptandığı halde, 2. dönemlerde yapıtlar iyi bilinmemektedir. Monositlerde bakterisidal katyonik proteinler yoktur. Laktoferin de bulunmamaktadır. Ancak MPO-H₂O₂ halid sistemi belirgindir. KGH'da monositlerin bakterisidal aktivitesi bozulmuştur. Monosit dokuda makrofaj haline döndüğünde ilave lizozomal strüktürler gelişir ve membran reseptörleri sentez edilir.

Makrofajların mikroorganizmaları öldürme mekanizması iyi bilinmemektedir. Makrofajlarda MPO bulunmamıştır. O₂ ve H₂O₂ oluşumunda yavaşır (monositlere göre). Makrofajlarda bulunan asid fosfataz, beta glukuronidaz, lipaz, lizozim ve hiyaluronidaz gibi enzimler de mikrobisidal etkiden daha çok dijestif rol oynamaktadırlar.

Mononükleer Fagositlerin Salgısal Ürünleri

Mononükleer fagositler büyük miktarda lizozim salgılar. Nötral proteazlar ve lizozomal asid hidrolaz makrofajlar tarafından salgılanır. Ayrıca prostaglandin, kompleman properdin komponentleri, interferon, kemik iliği ana hücre stimulatorü ve kan pıhtılaşmasını regüle eden substanslar mononükleer fagositler tarafından yapılır.

Intraselüler Mikroorganizmanın Akıbeti

Fagositte edilen mikroorganizma öldürülebilir ve sindirilebilir; öldürülür ve kötü bir şekilde parçalanabilir veya öldürülmez, yalnızca hücre içinde sekestre edilir. *M. tuberculosis* lizozomal yapıtlara dirençlidir. *M. lepraemurium* ve *M. leprae* de fagolizozomal yapıtlara dirençlidir (1, 2).

Lenfosit-Makrofaj İlişkisi

Duyarlaşmış lenfositler lenfokinler oluştururlar. Bunlardan biri olan MIF reaksiyon bölgesine gelen monositlerin orada tutulmasını sağlar. Bir diğer lenfokin olan gamma interferon da makrofajların öldürme fonksiyonlarını arttırabilir. Aktive makrofaj tanımını da hentiz tam olarak aydınlatıla-

mamıştır. Aktive olmuş makrofajda glikoz oksidasyonu, lizozomal ve antimikrobiyal, antitümör aktivite artmıştır. Antimikrobiyal aktivitesinin artma nedeni bilinmemektedir. Metabolizmasındaki artışın fagositozdaki artışa mı bağlı olduğu bilinmemektedir.

Spesifik olarak indüklenen hücre sel immünite makrofajın mikrobisidal aktivitesini arttırmaktadır. Bu fonksiyon non-spesifik olarak iş görmektedir. Örneğin *T. gondii* ile infekte hayvan *L. monocytogenes* ve diğer intraselüler parazitlere karşı da aktive makrofaj yeteneği göstermektedir (2, 3).

Kaynaklar

1. Barrett JT. Natural resistance and aquired immunity. In: Barrett JT, ed. *Textbook of Immunology*. St. Louis. C. V. Mosby, 1988: 251-271.
2. Drutz DJ, Mills J. Immunity-Infection. In: Stites DP, Stobo JD, Wells JV, eds. *Basic and Clinical Immunology*. 6th ed. California. Appleton-Lange. 1987: 167-185.
3. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunity to bacteria. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK, eds. *Immunology*. Edinburg. Churchill Livingstone, 1985: 16-6.
4. Roitt IM: Immunity to infection. In: Roitt IM, ed. *Essential Immunology*. 6th ed. London. ELBS, Blackwell. 1988: 154-171.