

# Model Tikus Omenn Syndrome

*Khie Khiong*

*Bagian Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung*

## Abstrak

*In 1965, Gilbert Omenn described a rare, inherited disorder which produced paradoxical combination of immunodeficiency and immune dysregulation. The term Omenn Syndrome was coined originating from this report. More than 40 years ago since it first described, the pathogenesis of OS has remained mysterious and these could be due to unavailable animal model for OS yet. This paper evaluates and discusses 2 murine models of OS that have been found and developed recently by 2 research groups from Japan and Italia. These two murine models bearing mutation in the V(D)J recombination analogous to those causing human OS. These two mouse models have been recapitulate the disease and provide insight into the pathogenesis of OS and also it relation with immunodeficiency combined with autoimmunity and atopy in OS and other related diseases.*

**Keywords:** *Omenn syndrome, Murine Model, Immunodeficiency, V(D)J Recombinase.*

## Pendahuluan

Omenn Syndrome (OS) ditemukan pertama kali oleh Gilbert Omenn pada tahun 1965<sup>1</sup> dan dideskripsikan sebagai suatu gejala klinis yang sangat jarang yang disebut sebagai retikulo-endotheliosis dengan karakteristik eosinofilia. Kelainan ini adalah kelainan genetik yang bersifat resesif otosomal yang sangat jarang yang ditunjukkan dengan munculnya berbagai gejala klinis yang kompleks dan disertai dengan infeksi yang berulang. Hal ini menunjukkan adanya kerusakan yang parah secara imunologikal, ditambah *co-exist* dengan sinyal aktivasi seperti tingginya jumlah sel-sel T yang teraktivasi, esinofilia, dermatitis, hepatosplenomegali, and terjadinya pembesaran pada nodus-nodus limpa.<sup>1-5</sup>

Omenn syndrome berbeda dengan *Severe Immunodeficiency Diseases* (SCID) dengan gejala tambahan berupa

otoimunitas dan atopi, yang secara signifikan memberikan disregulasi imun yang substansial.<sup>1,5-7</sup> Meskipun gambaran klinis OS beragam, umumnya pasien OS adalah bayi dengan keluhan erithroderma, alopesia, hepatosplenomegali, *lymphadenopathi*, diare kronik, gagal berkembang, dan infeksi berulang. Analisis darah perifer menunjukkan kadar eosinofil dan IgE yang tinggi, hipogammaglobulinemia, dan jumlah sel-sel B yang sedikit. Meskipun jumlah sel-sel T normal atau meningkat, umumnya menunjukkan *highly restricted* dan *repertoire* TCR yang oligoklonal. Bila dibiarkan, OS akan berakibat fatal sebagai akibat infeksi yang berulang, dan hanya dapat diterapi dengan transplantasi sumsum tulang belakang dan *cord blood stem cell*.<sup>8,9</sup>

Omenn syndrome dapat disebabkan karena kerusakan genetik yang mengakibatkan kerusakan pada perkembangan limfosit, antara lain

mutasi-mutasi yang mempengaruhi perkembangan timus (penyebab penyakit atipikal DiGeorge syndrome), reseptor-reseptor sitokin yang diperlukan untuk perkembangan sel-sel T atau *mitochondrial RNA processing*.<sup>7,10</sup>

Dari semua mutasi-mutasi ini, kerusakan genetik yang terkarakterisasi paling baik adalah mutasi yang terjadi baik itu homozigot atau heterozigot pada *Rag1* atau *Rag2*. *Rag1* dan *Rag2* secara bersama-sama mengkodekan kompleks protein yang bertanggung jawab dalam katalisasi rekombinasi V(D)J.<sup>4,11-14</sup> Proses ini penting untuk pengaturan ulang DNA pada lokus gen TCR dan Ig dan menghasilkan *repertoire* reseptor yang beragam yang diperlukan untuk perkembangan limfosit. Mutasi pada gen-gen *Rag* yang dikarakterisasi sebagai aktivitas hipomorfik dan parsial merupakan penyebab aktivitas rekombinasi V(D)J yang menurun. Kontrasnya bila mutasi yang terjadi pada *Rag* menyebabkan aktivitas rekombinasi hilang sama sekali, maka akan menyebabkan terjadinya SCID yang ditandai dengan kemampuan hanya memproduksi beberapa reseptor antigen yang produktif, yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya imunodefisiensi dan *repertoire* yang oligoklonal seperti pada OS.<sup>2, 13</sup>

### **Kombinasi Gejala-Gejala Imunologis yang Membingungkan pada OS**

Penelitian-penelitian mengenai OS pada manusia sudah sampai pada satu pemahaman bahwa patogenesis penyakit ini dipengaruhi oleh banyak faktor. Meskipun diduga ada kemungkinan gen modifier dan faktor epigenetik yang terlibat dalam patogenesis OS, sampai saat ini belum bisa dibuktikan.<sup>13</sup> Terjadinya pemaparan

terhadap antigen asing juga diduga memegang peranan yang penting dalam patogenesis OS, dalam hal ini stimulasi antigen akibat infeksi yang berulang akan memfasilitasi proliferasi limfosit termasuk beberapa limfosit yang memiliki karakteristik *self reactivity*.<sup>15</sup> Ketidak-seimbangan Tregs juga dipercaya sebagai salah satu penyebab hilangnya sifat imunitas yang toleran pada OS.<sup>6,7</sup> Patogenesis OS sampai saat ini masih menjadi teka-teki terutama dengan tidak tersedianya model tikus untuk penyakit ini sendiri. Tulisan ini mencoba untuk mengupas dua model tikus yang memiliki mutasi pada gen *Rag* dan menunjukkan manifestasi yang sama seperti pada pasien OS.

### **Dua Model Tikus untuk OS**

Model tikus untuk OS ditemukan oleh dua grup penelitian yang berbeda yang berasal dari Jepang dan Itali.<sup>16,17</sup> Khiong dkk, menemukan mutan yang memiliki mutasi pada *Rag1* secara spontan pada tikus C57BL/10 yang mengubah asam amino dari arginin menjadi glutamin pada posisi 972.<sup>16</sup> Tikus mutan ini memiliki jumlah sel-sel memori T yang berlebih, dan terjadi penghambatan pertumbuhan dan perkembangan baik pada sel T maupun pada sel B, yang mengakibatkan aktivitas rekombinasi menurun drastis. Selain itu tikus mutan ini juga memiliki kulit yang kemerah-merahan yang menunjukkan adanya infiltrasi oleh sistem imun, kadar eosinofil dan serum IgE yang meningkat tajam, oligoklonalitas pada sel-sel T dan terjadi abnormalitas pada jaringan timus, limpa dan nodus-nodus limpa. Semua gejala ini sangat konsisten dengan gejala-gejala yang teramati pada pasien-pasien OS. Mutan ini juga menunjukkan

hepatosplenomegali pada umur diatas 25 minggu. Khiong dkk, juga berhasil menjelaskan secara rinci hubungan dan mekanisme terjadinya atopi pada OS, yang diawali dengan produksi sitokin Th2 (IL-4 dan IL-6) yang berlebih oleh sel-sel CD4 T dan meningkatnya kadar serum IgE pada tikus mutan ini ternyata juga sangat tergantung dengan produksi sitokin ini. Disamping itu, Khiong dkk juga berhasil membuktikan bahwa sel-sel CD4 T pada tikus mutan ini mengalami proliferasi secara homeostatik pada kondisi *lymphopenia* yang sangat penting dan berarti terhadap perkembangan penyakit OS itu sendiri. Hasil penelitian oleh khiong dkk juga ditunjang oleh bukti-bukti yang dilaporkan pada berbagai studi OS sebelumnya pada manusia.<sup>6,7</sup>

Model tikus kedua merupakan hasil rekayasa genetik yang ditemukan oleh Marella dkk dengan cara membuat tikus *knock-in* yang membawa mutasi pada *Rag2* yang mengubah asam amino dari arganin menjadi glutamin pada posisi 229.<sup>17</sup> Perkembangan sel-sel T dan B pada tikus ini juga mengalami penghambatan seperti yang dijumpai pada pasien OS. Aktivitas rekombinasi juga menurun drastis dan 60% dari tikus-tikus ini mengalami alopesia. Jaringan timus, limpa dan nodus-nodus limpa pada tikus mutan ini juga menunjukkan adanya abnormalitas. Meskipun hanya sebagian kecil dari tikus-tikus mutan menunjukkan kadar IgE dalam serum yang tinggi, tikus ini juga menunjukkan kadar eosinofil yang tinggi, sel-sel T yang *restricted*/terbatas dan hipogammaglobulinemia seperti yang ditemukan pada pasien OS. Marella dkk mencatat bahwa ekspresi AIRE di timus sangat rendah dan tidak ada ekspresi Foxp3+ Tregs pada tikus mutan bila dibandingkan dengan tikus

kontrol. Fakta ini sangat penting dan menyokong asumsi bahwa terjadi kerusakan *central* dan *periferal tolerance* pada OS.

### Gambaran Baru mengenai Patogenesis OS

Integrasi gambaran klinis kedua model tikus ini memberikan pemahaman yang lebih terperinci dan baru mengenai patogenesis OS pada manusia. Hasil kedua penelitian ini menunjukkan bahwa OS dapat berkembang bahkan pada kondisi lingkungan laboratorium yang bebas kuman patogen. Ini mengindikasikan bahwa variasi ekspresi fenotipik bukan semata-mata disebabkan oleh pengaruh lingkungan atau dengan kata lain pengaruh lingkungan tidak banyak berperan terhadap patogenesis OS, meskipun beberapa gejala OS terlihat dipengaruhi juga oleh lingkungan.

Model tikus ini menunjukkan bahwa generasi limfosit tidak terjadi sehingga menyebabkan sel-sel limfosit yang jumlahnya tidak beragam tersebut memperbanyak diri sehingga menyebabkan terjadinya kondisi *lymphopenia* dan berasosiasi dengan diversitas repertoire sel-sel T dan B yang *restricted*/terbatas. Kondisi ini terjadi dan terlihat pada pasien-pasien OS dan pada kedua model tikus ini yang memiliki mutasi pada gen-gen *Rag*. Proses *rearrangements* TCR dan IgG merupakan suatu mekanisme yang memastikan bahwa dua individu yang berbeda akan memiliki *repertoire* reseptor antigen yang tidak sama. Ini yang menjadi penjelasan yang sangat masuk akal sekali mengapa terjadi variasi fenotipik diantara pasien OS dan juga pada kedua model tikus ini. Semua tergantung dengan ketersediaan klon-

klon limfosit yang akan mengalami ekspansi yang dikombinasikan dengan pengalaman imunologik masing-masing individu dan interaksi keduanya akan menyebabkan dan menentukan insiden otoreaktivitas dan juga jumlah Tregs yang dihasilkan.

Pada kedua model tikus ini, kerusakan pada *central tolerance* disebabkan karena kerusakan lingkungan mikro timus seperti yang terlihat pada DiGeorge syndrome atau rendahnya output sel-sel T yang berfungsi memfasilitasi proses rekombinasi atau karena defisiensi reseptor IL-7, terjadinya perubahan pada jaringan timus dan secara bersamaan terjadi penurunan ekspresi AIRE di epitel medulla timus mengakibatkan proses seleksi negatif tidak berjalan dengan sempurna dan menyebabkan klon sel-sel T yang bersifat otoreaktif tetap ada dan menyebabkan penurunan *central tolerance* yang dimediasi oleh Tregs.

Kondisi yang abnormal ini akan memicu terjadinya kondisi lymphopenia yang selanjutnya berkontribusi terhadap peredaran sel-sel limfosit di daerah perifer. Kondisi *lymphopenia* disebabkan karena mutasi genetik yang mengaktifasi terjadinya proliferasi sel-sel T perifer dan menyokong terjadinya interaksi *self-MHC* dan produksi berbagai macam sitokin dan juga Tregs.<sup>18,19</sup> Kondisi *lymphopenia* ini juga terjadi dan berhasil diamati pada tikus mutan yang ditemukan oleh Khiong dkk. Sudah sejak lama diduga bahwa keadaan *lymphopenia* yang berlangsung lama akan menginduksi terjadinya proliferasi sel-sel T secara homeostatik dan ini pada akhirnya akan menyebabkan klon *self-reactive* sel-sel T dengan fenotip teraktivasi atau memori

terekspansi seperti yang teramati di pasien dan tikus OS. Terjadinya penurunan ekspresi Tregs yang berhasil diamati oleh Marella dkk mungkin turut bertanggung jawab terhadap penurunan *peripheral tolerance*.

Gambaran alergi juga terlihat pada pasien OS dan juga pada mutan tikus yang ditemukan oleh Khiong dkk. Hal ini menunjukkan bahwa proliferasi sel-sel T berimplikasi terhadap kondisi *hyper IgE* pada OS.<sup>16</sup> Penelitian-penelitian lain juga menerangkan bahwa proliferasi sel-sel T secara homeostatik pada OS menyebabkan produksi sitokin Th2 dan *repertoire* sel-sel T yang *restricted* dapat menyebabkan gejala-gejala multiorgan yang disebabkan oleh sitokin Th2 pada tikus-tikus yang limfopenik.<sup>20,21</sup> Kerusakan intrinsik sel-sel B mungkin turut pula memfasilitasi keadaan atopi pada OS. Protein-protein mutan *Rag* mungkin akan menyebabkan terjadinya defisit reseptor yang bertugas memfasilitasi *rearrangement* IgG yang mengkodekan reseptor otoreaktivitas dan menyebabkan terjadinya persistensi dari sel-sel B yang akan memproduksi otoantibodi.<sup>22</sup> Peningkatan stimulasi antigen dapat disebabkan oleh ketidak-efisienan proses penghilangan antigen asing yang masuk yang pada akhirnya akan meningkatkan produksi IL-4 dan dapat menyebabkan terjadinya peningkatan siklus sel sehingga produksi sitokin Th2 akan meningkat dan menyebabkan terjadinya *IgE class switching*. Selanjutnya sentrum germinal pada tikus OS dismorfik dan hanya memiliki sedikit sel-sel B yang matang yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya fenotip sentrum germinal yang tidak matang yang menyebabkan terjadinya produksi IgE.<sup>23</sup>

**Tabel Perbandingan Karakteristik antara MM Mice, Mutan R229Q Rag2, dan Omenn Syndrome pada Manusia**

<b>Karakteristik</b>	<b>MM Mice</b>	<b>Mutan R229Q Rag2</b>	<b>OS pada Manusia</b>
Mutasi	Spontan, R972Q Rag1	<i>Knock-in</i> R229Q Rag2	Rag1, Rag2, IL-7 $\alpha$ , artemis, Jak3, ADA, CD45, dan CD3
Perkembangan Limfosit T dan B	Terhambat	Terhambat	Terhambat
<i>Activated</i> dan <i>memory T cells</i>	Bertambah	Bertambah	Bertambah
Aktivitas Rekombinase	Menurun	Menurun	Menurun
Erythrodermia	hanya <i>skin redness</i>	4%	Sebagian besar
Peningkatan IgE	Seluruhnya	Sebagian kecil	Sebagian besar
Eosinofil	Meningkat	Meningkat	Meningkat
Oligoklonalitas Limfosit T dan B	✓	✓	✓
Jaringan Timus, Limpa dan Nodus Limpa	Abnormal dan struktur berubah	Abnormal dan struktur berubah	Abnormal dan struktur berubah
Hepatosplenomegali	✓ (pada tikus usia tua)	✗	✓
Lymphadenopati	✗	✗	✓
Alopesia	✗	60%	✓
Hipogammaglobulinemia	hanya IgA dan IgG3	✓	✓
<i>Wasting Syndrome</i>	✗	✓	✗
Peran Faktor Lingkungan terhadap Patogenesis OS	Tidak banyak berperan meskipun ada beberapa gejala yang dipengaruhi oleh lingkungan	Tidak banyak berperan meskipun ada beberapa gejala yang dipengaruhi oleh lingkungan	Diduga faktor lingkungan berperan terhadap patogenesis OS
Patogenesis OS	Kerusakan <i>central tolerance</i> menyebabkan kondisi <i>lymphopenia</i> sehingga <i>peripheral tolerance</i> terganggu dan mengakibatkan OS	Kerusakan <i>central tolerance</i> menyebabkan kondisi <i>lymphopenia</i> sehingga <i>peripheral tolerance</i> terganggu dan mengakibatkan OS	Ada banyak faktor yang mempengaruhi OS termasuk teori <i>central</i> dan <i>peripheral tolerance</i>
Mekanisme Patogenesis	Proliferasi homeostatik CD4+ T cells	Ekspresi AIRE dan Foxp3+ Tregs yang menurun	Banyak teori termasuk teori proliferasi homeostatik
Mekanisme Lain yang Baru	Mekanisme terjadinya kondisi hiper IgE dan atopi akibat produksi sitokin Th2 berlebih oleh proliferasi homeostatik CD4+ T cells	Penurunan ekspresi AIRE menyebabkan seleksi negatif limfosit T terganggu dan ekspresi Tregs menurun sehingga <i>peripheral tolerance</i> terganggu	✗

## Kesimpulan

Kedua grup peneliti berhasil mengembangkan dua model tikus yang valid untuk OS yang memungkinkan penelitian lebih lanjut mengenai OS itu sendiri. Kedepannya dua model tikus ini dapat digunakan untuk menjelaskan terjadinya variasi fenotipik yang banyak dijumpai di antara pasien-pasien OS. Selanjutnya dengan ketersediaan model tikus ini, tentu saja pengaruh faktor lingkungan, faktor genetik dan juga faktor epigenetik akan dapat dibedakan dan dijelaskan lebih rinci lagi. Kemungkinan lain adalah abnormalitas fenotipik lainnya yang ditemukan pada pasien OS itu sendiri dan pada kedua jenis model tikus ini dapat diteliti lebih jauh. Tikus-tikus mutan ini merupakan model yang dapat dipakai untuk mempelajari lebih jauh lagi mengenai mekanisme yang mendasari kompleksitas penyakit ini dan juga dapat memfasilitasi peluang penemuan dan pengembangan terapi yang baru untuk OS.

## Daftar Pustaka

1. Omenn G. Familial Reticuloendotheliosis with Eosinophilia. *N. Eng. J. Med*, 1965; 273: 427-32.
2. Villa, A., Santagata, S., Bozzi, F., Giliani, S., Frattini, A., Imberti, L., Gatta, L.B., Ochs, H.D., Schwarz, K., Notarangelo, L.D., Vezzoni, P., dan Spanopoulou, E. Partial V(D)J Recombination Activity Leads to Omenn Syndrome. *Cell*, 1998; Vol 93; 885-96.
3. Villa, A., Cristina, S., dan Vezzoni, P. Recombination Activating Gene and Its Defects. *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol*, 2001; Vol 1; 491-95.
4. Cristina, S., Marella, V., Rucci F., Vezzoni, P., dan Villa, A. Rag-Dependent Primary Immunodeficiencies. *Hum. Mutation*, 2006; 1-11.
5. Aleman, K., Noordzij, J.G., de Groot, R., van Dongen, J.J.M., dan Hartwig, N.G. Reviewing Omenn Syndrome. *Eur. J. Pediatr*, 2001; 718-25.
6. Notarangelo, L.D., Gambineri, E., dan Badotalo, R. Immunodeficiency with autoimmune consequences. *Adv. Immunol*, 2006; Vol 89; 321-70.
7. Honig, M., dan Schwarz, K. Omenn Syndrome: A Lack of Tolerance on the Background of Deficient Lymphocyte Development and Maturation. *Curr. Opin. Rheumatol*, 2006; Vol 18; 383-88.
8. Gomez, L., Le Deist, F., Blanche, S., Cavazzana-Calvo, M., Griscelli, C., and Fischer A. Treatment of Omenn Syndrome by Bone Marrow Transplantation. *J. Pediatr*, 1995; Vol 127; 76-81.
9. Wong, S.Y., dan Roth, D.B. Murine Model of Omenn Syndrome. *J. Clin Invest*, 2007; Vol 117; 1213-16.
10. Roifman, C.M., Gu, Y., dan Cohen, A. Mutations in the RNA Component of RNase Mitochondrial RNA Processing might Cause Omenn Syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol*, 2006; Vol 117; 897-903.
11. Santagata, S., Villa, A., Sobacchi, C., Cortes, P., dan Vezzoni, P. The Genetic and Biochemical Basis of Omenn Syndrome. *Immun. Reviews*, 2000; Vol 178; 64-74.
12. Wada, T., Takei, K., Kudo, M., Shimura, S., Kasahara, Y., Koizumi, S., Kawa-Ha, K., Ishida, Y, Imashuku, S., Seki, H., dan Yachie, A. Characterization of Immune Function and Analysis of Rag gene mutations in Omenn Syndrome and Related Disorder. *Clin. Exp. Immunol*, 2000; Vol 119; 148-55.
13. Villa, A., Sobacchi, C., Notarangelo, L.D., Bozzi, F., Abinun, M., Abrahamsen, T.G., Arkwright, P.D., Baniyash, M., Brooks, E.G., Conley, M.E., Cortes, P., Duse, M., Fasth, A., Filipovich, A.M., Infante, A. J., Jones, A., Mazzolari, E., Muller, S.M., Pasic, S., Rechavi, G., Sacco, M.G., Santagata, S., Schroeder, L.B., Ochs, V., Vezzoni, P., Frienrich, W., dan Schwarz, K. V(D)J Recombination Defects in Lymphocytes due to RAG Mutations:

- Severe Immunodeficiency with Spectrum of Clinical Presentations. *Blood*, 2001; Vol 97; 81-88.
14. Kato, M., Kimura, H., Seki, M., Shimada, A., Hayashi, Y., Morio, T., Kumaki, S., Ishida, Y., Kamachi, Y., dan Yachie, A. Omenn Syndrome-Review of Several Phenotypes of Omenn Syndrome and Rag1/Rag2 Mutations in Japan. *Allergology International*, 2006; Vol 55; 115-19.
  15. Corneo, B., Moshous, D., Gungor, T., Wulfraat, N., Philippet, P., Le Deist, F., Fischer, A., dan de Villartay, J.P. Identical Mutations in *ag1* and *Rag2* Genes Leading to Defective V(D)J Recombinase Activity can Cause either T-B-Severe Combined Immune Deficiency or Omenn Syndrome. *Blood*, 2001. 97: 2772-6.
  16. Khiong, K., Murakami, M., Kitabayashi, C., Ueda, N., Sawa, S., Sakamoto, A., Kotzin, B.L., Rozzo, S.J., Ishihara, K., Verella-Garcia, M., Kappler, J., Marrack, P., dan Hirano, T. Homoeostatically Proliferating CD4+ T Cells are Involved in the Pathogenesis of an Omenn Syndrome Murine Model. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. Vol. 117(5);1270-81.
  17. Marella, V., Poliani, P.L., Casati, A., Rucci, F., Frascoli, L., Gougeon, M.L., Lemencie, B., Bosticardo, M., Ravanini, M., Battaglia, M., Roncarolo, M.G., Cavazzana-Calvo, M., Facchetti, F., Notarangelo, L.D., Vezzoni, P., Grassi, F., dan Villa, A. A Hypomorphic R229Q *Rag2* Mouse Mutant Recapitulates Human Omenn Syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. Vol. 117(5);1260-9.
  18. Baccala, R., dan Theofilopoulos, A.N. The New Paradigm of T-Cell Homeostatic Proliferation-induced Autoimmunity. *Trends Immunol.* 2005. 26: 5-8.
  19. Curroto de Lafaille, M.A., Shen, S., Olivares-Villagomez, D., Camps-Ramirez, M., dan Lafaille, J.J. Do Regulatory T Cells Play a Role in the Control of Homeostatic Proliferation. *Int. Rev. Immunol.* 2005. 24: 269-84.
  20. Curotto de Lafaille, M.A., dan Lafaille, J.J. The Role of Regulatory T Cells in Allergy. *Springer Semin. Immunopathol.* 2004. 25: 295-310.
  21. Milner, J.D., Fry, T.J., dan Mackall, C.I. Autoimmunity during Lymphopenia: A Two-Hit Model. *Clin. Immunol.* 2006. 120: 121-8.
  22. Jankovic, M., Casselas, R., Yannoutsos, N., Wardemann, H., dan Nussenzweig, M.C. Rags and Regulation of Autoantibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 2004. 22: 485-501.
  23. Aalberse, R.C. dan Platts-Mills, T.A. How do We Avoid Developing Allergy: Modifications of the Th2 Response from a B Cell Perspective. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2004. 113: 983-6.

