

Perbedaan Morfologi dan Ekspresi Dazl dan Vasa pada Sel Germinal Fetus dan Anak Mencit Jantan

(*DIFFERENCE IN MORPHOLOGY AND DAZL AND VASA EXPRESSION OF MALE GERM CELLS AT FETAL DAN INFANT AGES IN MICE*)

**Wahono Esthi Prasetyaningtyas^{1*}, Ni Wayan Kurniani Karja²,
Mokhamad Fahrudin¹, Kusdiantoro Mohamad¹, Srihadi Agungpriyono¹**

¹Divisi Anatomi, Histologi dan Embriologi, ²Divisi Reproduksi dan Kebidanan,
Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia, 16680

*E-mail: wahono_esti@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

Germ cells are one source of totipotent cells that play a role in the formation of new organisms. The morphology and expression of proteins in germ cells are dynamic depending on age and developmental stage. This study was aim to observe changes in germ cell morphology and protein expression in male fetuses at 13.5 days postcoital (dpc) and mice aged five days postnatal. The genital ridge and testes were isolated from mice aged 13.5 dpc and 5 days. The tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE) staining, and to identify the presence of Dazl, Vasa, and Oct4 proteins used immunohistochemical staining. The results showed that the morphology of germ cells in mice fetuses ages 13.5 dpc and mice aged five days postnatal both had a round-oval shape, but at five days postnatal, they had a larger size and fewer numbers. Male germ cells aged 13.5 dpc showed weak positive for Oct 4 and DAZL antibodies and strong positive for Vasa antibodies. At the age of five days postnatal, male germ cells showed strong positive results for Oct-4 and DAZL antibodies and weak positive for Vasa antibodies. In conclusion, that the morphology and expression protein of germ cell markers influenced the stages of growth and development of germ cells. Vasa can be used as a marker for germ cells in mice fetuses ages aged 13.5 dpc and DAZL as a marker for germ cells aged five days postnatal.

Keywords: fetal; PGCs; postnatal; male germ cells; morphology

ABSTRAK

Sel germinal merupakan salah satu sumber sel yang masih bersifat totipotensi dan berperan dalam pembentukan organisme baru. Morfologi dan ekspresi protein pada sel germinal bersifat dinamis bergantung pada umur dan tahap perkembangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati perubahan morfologi dan ekspresi protein sebagai marka sel germinal jantan pada fetus umur 13,5 hari pascakawin (*days post coital/ dpc*) dan anak mencit umur lima hari pascalahir. Hasil Rigi kelamin dan testis diisolasi dari mencit umur 13,5 dpc dan 5 hari. Jaringan kemudian dipreparasi histologi rutin, dan diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE), sedangkan untuk mengidentifikasi keberadaan protein Dazl, Vasa dan Oct4, jaringan diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia menunjukkan morfologi sel germinal jantan pada fetus mencit umur 13,5 dpc dan anak mencit umur lima hari pascalahir sama-sama berbentuk bulat oval. Namun, sel germinal jantan pada mencit umur lima hari pascalahir berukuran lebih besar, jumlah yang lebih sedikit dan terletak jauh dari membran basal. Pada sel germinal jantan umur 13,5 dpc menunjukkan positif lemah terhadap antibodi Oct 4 dan DAZL serta positif kuat terhadap antibodi Vasa. Pada umur lima hari, sel germinal jantan menunjukkan positif kuat terhadap antibodi Oct-4 dan DAZL, serta positif lemah terhadap antibodi Vasa. Simpulan dari penelitian ini adalah morfologi dan ekspresi marka sel germinal dipengaruhi oleh tahapan pertumbuhan dan perkembangan sel-sel germinal. Vasa dapat digunakan sebagai marka untuk sel germinal umur 13,5 dpc dan DAZL sebagai marka untuk sel germinal umur lima hari pascalahir.

Kata-kata kunci: fetus; pascalahir; PGCs; sel germinal jantan; morfologi

PENDAHULUAN

Pada sebagian besar organisme multiseleuler, sel germinal adalah asal dari organisme baru yang akan memberikan pewarisan genetik dan informasi epigenetik pada generasi berikutnya. Sel germinal sebagai sumber sel yang bersifat totipoten, berperan dalam pembentukan organisme baru (Nikolic *et al.*, 2016). Pada awal perkembangannya, sel germinal berasal dari sekumpulan sel somatis yang terlokalisasi dan bersifat totipoten (Saitou dan Yamaji, 2012). Cikal bakal sel germinal berasal dari bagian epiblas (Zhao dan Garbers, 2002), yang terbentuk pada 7,5 hari pascakawin (*day post coital*, dpc). Sel germinal pada awal perkembangan ini disebut dengan *primordial germ cells* (PGCs). *Primordial germ cells* atau benih sel germinal merupakan prekursor sel gamet, yang secara normal dapat berkembang menjadi spermatozoa dan oosit. Beberapa peneliti menganggap PGCs bersifat pluripoten, karena dalam perkembangannya dapat menghasilkan zigot yang bersifat totipoten setelah fertilisasi. Identitas ganda dari PGCs yang terdiferensiasi dan pluripoten yang menjadikan PGCs dijadikan sebagai model yang unik untuk mempelajari takdir dan fleksibilitas sel (De Miguel *et al.*, 2018).

Beberapa tahapan terkait perkembangan sel germinal menjadi sel gamet pada hewan dibagi menjadi tiga tahap, yakni: spesifikasi PGCs, determinasi jenis kelamin dan gametogenesis (Hayashi dan Saitou, 2014). Spesifikasi PGCs terjadi ketika PGCs terbentuk dan mengalami migrasi kaudal alantois ke rigi kelamin. Migrasi PGCs terjadi pada hari ke-8,5 dpc dan mencapai rigi kelamin pada hari ke-11,5 dpc (Saitou dan Yamaji, 2012). Sesampainya di rigi kelamin, sel germinal menerima signal dari lingkungan dan signal tersebut menginisiasi sel untuk mengalami pembelahan secara mitosis, meiosis dan berdiferensiasi (Nikolic *et al.*, 2016). Determinasi jenis kelamin menjadi jantan atau betina terjadi pada hari ke-11,5–12,5 dpc. Setelah lahir, kira-kira pada hari ke-5, sel germinal aktif berproliferasi dan apoptosis dan menjadi gonosit (pra-spermatogonia) yang nantinya berubah menjadi *spermatogonial stem cells* (Saitou dan Yamaji, 2012). *Spermatogonial stem cells* inilah yang berperan dalam pembentukan spermatozoa pada proses spermatogenesis.

Selama proses perkembangannya, sel germinal mengekspresikan banyak gen yang

ditranslasikan sebagai protein. Beberapa gen dan protein digunakan sebagai penanda (marka) sel germinal, seperti protein *Octamer-binding transcription factor* (Oct4), *B-lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp1), *Developmental Pluripotency Associated 3* (DPPA3/stella), *Fragilis*, *DEAD-Box Helicase 4* (DDX-4/Vasa) dan *Deleted in Azoospermia-Like* (DAZL). Penelitian ini bertujuan untuk mengamati perubahan sel germinal mencit jantan secara morfologi dan ekspresi dari DAZL, Vasa dan Oct4 pada fetus umur 13,5 dpc dan anak umur lima hari pascalahir.

METODE PENELITIAN

Hewan Penelitian

Penelitian ini menggunakan fetus mencit jantan umur 13,5 *day post coital* (dpc) dan anak-anak mencit jantan umur lima hari pascalahir, masing-masing sebanyak tiga ekor. Fetus dan anak mencit didapatkan dengan cara mengawinkan mencit betina dewasa dengan jantan dewasa dengan perbandingan 1:1 tanpa stimulasi hormon. Pengamatan sumbat vagina (*vaginal plug*) pada mencit betina dilakukan pada keesokan harinya setelah dicampur dengan mencit jantan. Bila terdapat sumbat vagina maka mencit dianggap telah kawin dan dihitung sebagai hari ke-1 *post coitus* (dpc). Mencit dipelihara di Unit Pengelolaan Hewan Laboratorium SKHB IPB dengan pemberian ransum standar dan air minum secara *ad libitum*. Kelayakan penggunaan hewan untuk penelitian telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis IPB dengan sertifikat persetujuan etik hewan nomor 089/KEH/SKE/III/2018.

Isolasi Rigi Kelamin dan Testis

Rigi kelamin diisolasi dari fetus mencit umur 13,5 dpc menggunakan metode yang dikembangkan oleh Moreno-Ortiz *et al.* (2009). Induk fetus sebelumnya dikorbankan nyawanya dengan menggunakan anestesi Ketamin dan Xylazine 0.1 mL/100 g mencit (yang berisi 91 mg/kg Ketamine 9.1 mg/kg Xylazine) secara intra peritoneal. Fetus dikeluarkan dari uterus dengan cara laparotomi, kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% dan *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (DPBS, Lonza 17-512F). Selanjutnya, kepala fetus dipisahkan dari abdomen menggunakan skalpel. Usus dan hati dikeluarkan dari rongga abdomen sehingga sistem urogenitalis terlihat jelas menggunakan

mikroskop stereo (Olympus SZX7, Japan). Rigi kelamin ditemukan menempel pada duktus mesonefros yang berada di sekitar ginjal. Rigi kelamin dengan morfologi yang menunjukkan kelamin jantan (Prasetyaningtyas *et al.*, 2019) diisolasi berikut jaringan di sekitarnya menggunakan pinset dan *disposable syringe* 26 G, kemudian dipindahkan ke dalam larutan fiksatif paraformaldehid 4%.

Testis diisolasi dari anak mencit jantan umur lima hari pascalahir. Mencit dianestesi dengan menggunakan suhu dingin (fetus diletakkan di atas es batu), lalu dikorbakan nyawanya dengan cara dekapitasi. Testis dikeluarkan dari skrotum dan dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis 0,9% dan DPBS (pH 7-7.6). Tunika vaginalis dan epididimis dipisahkan dari testis di bawah pengamatan mikroskop stereo (Olympus SZX7), kemudian difiksasi dengan paraformaldehid 4%.

Histologi Rigi Kelamin dan Testis

Sampel yang telah difiksasi dengan larutan paraformaldehid 4% kemudian diproses menurut standar histologis sampai menjadi blok parafin. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 μ m menggunakan mikrotom, dilekatkan pada gelas objek dan diinkubasi semalam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Untuk melihat morfologi sel germinal, jaringan rigi kelamin dan testis diwarnai dengan pewarnaan rutin hematoxilin-eosin, sedangkan untuk melihat keberadaan protein DAZL, Vasa dan Oct4, jaringan diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia (IHK kit AB64261, Abcam UK), menggunakan antibodi Oct4 (AB59545, Abcam UK), Vasa (AB34139, Abcam UK) dan DAZL (AB13840, Abcam UK).

Analisis Data

Sel germinal dari rigi kelamin dan testis diamati dan dianalisis secara deskriptif, baik untuk morfologi dengan pewarnaan HE maupun ekspresi DAZL, Vasa dan Oct4 dengan pewarnaan imunohistokimia. Semua hasil pengamatan didokumentasikan dengan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus SZX7) yang dilengkapi dengan mikrofotografi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

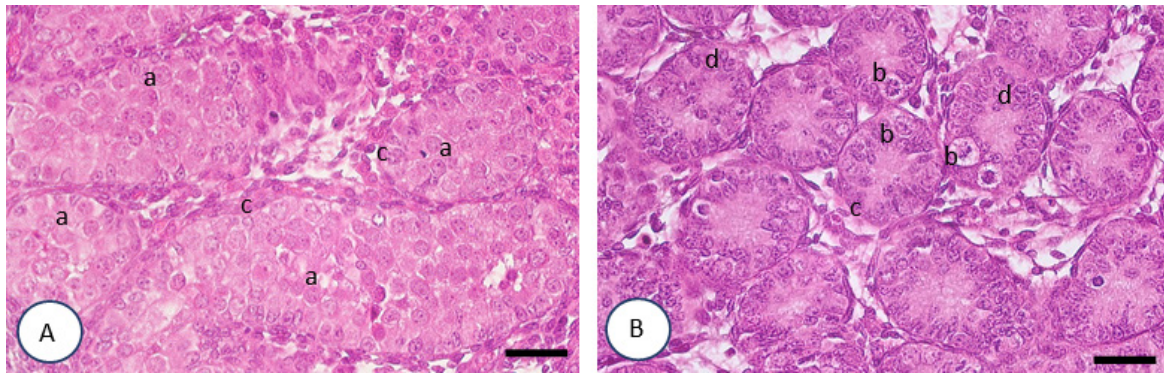
Morfologi tali testis bakal tubulus seminiferous pada rigi kelamin fetus mencit umur 13,5 dpc serta testis anak mencit umur lima hari pascalahir memperlihatkan adanya

kemiripan, namun sel germinal yang ada di dalam tali testis pada keduanya berbeda (Gambar 1). Morfologi sel germinal yang terdapat pada tali testis fetus umur 13,5 dpc terlihat berbentuk bulat-oval, memiliki ukuran sel dan inti sel yang besar dengan sitoplasma bergranul. Pada tali testis anak-anak mencit umur lima hari pascalahir, sel germinal atau disebut juga gonosit memiliki ukuran yang lebih besar dari sel germinal fetus, tetapi sama-sama berbentuk bulat-oval dan sitoplasma bergranul. Bentuk sel germinal yang berbentuk bulat-oval dengan sitoplasma bergranul ini sesuai dengan pendapat Yön dan Aksulut (2015).

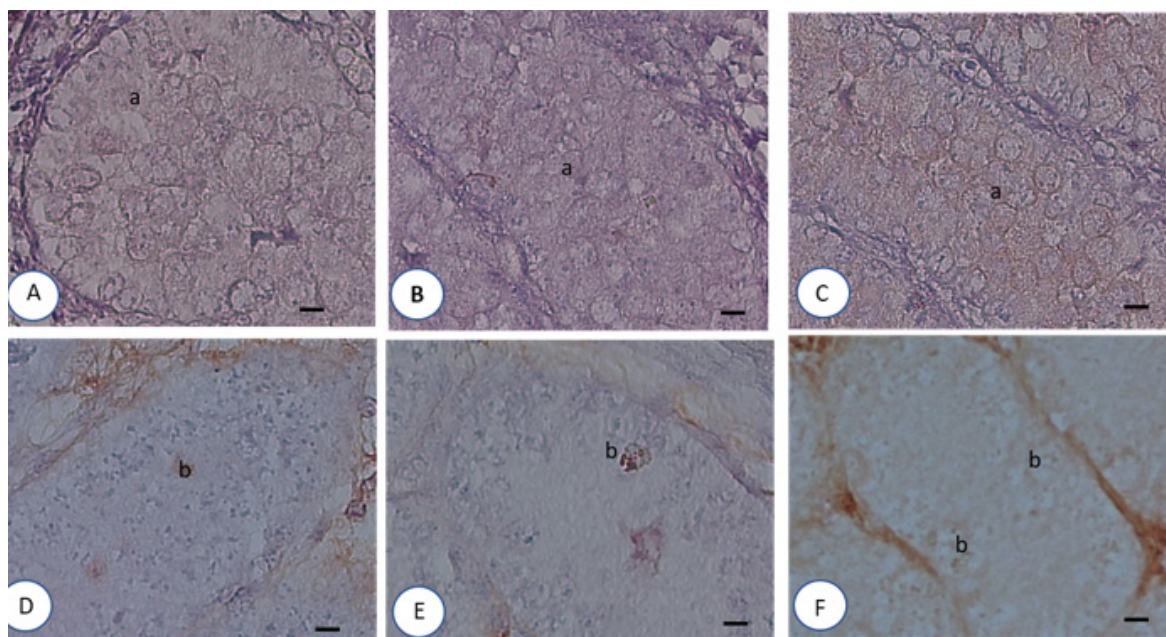
Hasil pengamatan menunjukkan sel germinal pada tali testis fetus mencit umur 13,5 dpc lebih banyak dibandingkan gonosit pada testis anak mencit umur lima hari pascalahir. Hal ini disebabkan oleh proses rekrutmen dari sel germinal menjadi gonosit atau pra-spermatogonia. Pada awal perkembangan PGCs, jumlah sel epiblas kira-kira 40–50 sel pada hari ke-7,5 dpc (Zhao dan Garbers, 2002, Sabour *et al.*, 2011; Yön dan Akbulut, 2015), kemudian bermigrasi menuju ke rigi kelamin (Saitou dan Yamaji, 2012). Sel germinal berproliferasi sampai hari ke-13,5 dpc dan penentuan jenis kelamin terjadi pada hari ke-11,5 hingga 12,5 dpc.

Primordial germ cells (PGCs) XX (betina) pada hari ke-13,5 dpc mengalami pembatasan jumlah berkisar 25.000 sel dan perkembangannya mulai memasuki tahap pembelahan meiosis tetapi berhenti di tahap profase I. Berbeda dengan PGCs XX, PGCs XY pada hari ke-13,5 dpc tetap berada pada tahap mitosis dan memasuki fase G0/G1 (Nikolic *et al.*, 2016). Sel germinal jantan saat lahir sampai hari ke-5 pascalahir, akan direkrut menjadi gonosit (pra-spermatogonia). Ketika memasuki umur enam hari, gonosit berubah menjadi *spermatogonial stem cells* (SSC) atau spermatogonia tipe A1 yang bergeser ke arah membran basal dan ukurannya menjadi lebih kecil dibandingkan gonosit (Wu *et al.*, 2009).

Sel germinal mengekspresikan banyak gen yang terkait dengan proses perkembangannya. Dinamika ekspresi gen pada perkembangan PGCs seperti *Stella*, *Fragilis*, *Blimp1*, *Prdm*, *Vasa*, dan *DAZL* (Nikolic *et al.*, 2016) terjadi sesuai dengan umur dan tahap perkembangan. Ekspresi gen berupa protein-protein yang digunakan sebagai *marker* dalam perkembangan sel germinal.



Gambar 1. Morfologi tali-tali testis fetus mencit jantan umur 13,5 dpc (A) dan anak mencit umur 5 hari pascalahir (B). Sel germinal (a), pra-spermatogonia (b), tali testis (c), sel pra-Sertoli (d). Pewarnaan HE. Bar = 50 mm.



Gambar 2. Ekspresi *germcell-specific markers* pada sel-sel germinal di tali-tali testis fetus mencit jantan umur 13,5 dpc (A, B, C) dan anak mencit jantan umur 5 hari pascalahir (D, E, F). A, D menggunakan antibodi Oct4, B, E menggunakan antibodi Dazl, C, F menggunakan antibodi Vasa. Sel germinal (a) terekspresi positif lemah terhadap antibodi Oct4 dan Dazl, serta terekspresi positif kuat terhadap antibodi Vasa. Sel pra-spermatogonia (b) positif kuat terhadap antibodi Oct4 dan Dazl dan positif lemah terhadap antibodi Vasa. Pewarnaan imunohistokimia. Bar=10mm

Ekspresi *germ cell-specific markers* pada penelitian ini diamati dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi Oct4, Dazl, dan Vasa. Sel germinal fetus mencit jantan umur 13,5 dpc menunjukkan positif lemah terhadap antibodi Oct4 dan Dazl. Namun, positif kuat terhadap antibodi Vasa. Sel germinal anak mencit umur

lima hari pascalahir menunjukkan hasil positif kuat terhadap antibodi Oct4 dan Dazl namun positif lemah terhadap antibodi Vasa.

Ekspresi Oct4 bertujuan untuk memvalidasi sifat pluripotensi dari sel germinal. Penanda ini sama untuk pewarnaan sel punca (Nikolic *et al.*, 2016; Shah *et al.* 2016). Sel germinal mencit fetus jantan pada umur 13,5 dpc menunjukkan

positif lemah terhadap ekspresi Oct4 karena pada umur ini, sel germinal memasuki tahap interfase (Nikolic *et al.*, 2016), sedangkan pada mencit jantan umur lima hari, sel germinal menunjukkan positif kuat terhadap Oct4 karena gonosit mempunyai potensi pluripotensi sebagai sel punca (Wu *et al.*, 2009). Sel gonosit dari mencit jantan umur lima hari berdiferensiasi menjadi SSC. Gonosit yang dikultur selama tiga dan enam hari menunjukkan reaksi kuat terhadap antibodi Oct4 yang mengindikasikan sel telah berdiferensiasi (Prasetyaningtyas *et al.*, 2020). Gen Oct4 merupakan gen yang umum untuk menunjukkan ekspresi terhadap sifat pluripotensi, maka pada penelitian ini tidak dipertimbangkan sebagai marka untuk sel germinal jantan.

Marka DAZL merupakan protein yang dikode oleh gen DAZL, anggota dari famili gen DAZ (*Deleted in Azoospermia*) yang esensial dalam proses spermatogenesis. Protein ini berfungsi pada tahap pembentukan PGCs sehingga ketiadaan protein DAZL dapat menyebabkan penurunan jumlah sel germinal sebelum lahir dan kegagalan perubahan bentuk dari gonosit menjadi SSC (Ma *et al.*, 2013). Protein DAZL ini berperan penting dalam proses spermatogenesis, terutama dalam perubahan dari gonosit menjadi SSC. Hal ini terlihat dari reaksi positif kuat di sel germinal mencit jantan umur lima hari pascalahir. Dengan demikian, DAZL dapat digunakan secara lebih spesifik sebagai marka untuk sel germinal jantan pada mencit umur lima hari pascalahir.

Produk gen Vasa terekspresi di PGCs pada awal perkembangan yang berfungsi dalam proses diferensiasi sel germinal (PGCs) menjadi gamet. Ketiadaan Vasa dapat berefek pada gangguan proses diferensiasi sel germinal yang akan menyebabkan infertilitas pada jantan (Raz 2000). Pada mencit, ekspresi protein MVH (*mouse vasa homolog*) terjadi secara eksklusif dari PGCs selama embriogenesis dan gametogenesis, baik pada jantan maupun betina (Tanaka *et al.*, 2000). Ekspresi protein Vasa terlihat lebih kuat pada sel germinal fetus jantan umur 13,5 dpc dibandingkan pada sel germinal anak mencit jantan umur lima hari pascalahir. Hasil ini memungkinkan Vasa bisa digunakan sebagai marka spesifik untuk sel germinal jantan pada fetus umur 13,5 dpc.

SIMPULAN

Morfologi sel germinal jantan pada fetus mencit umur 13,5 dpc dan anak mencit umur lima hari pascalahir sama-sama berbentuk bulat oval, namun sel germinal jantan pada mencit umur lima hari pascalahir berukuran lebih besar, jumlah yang lebih sedikit dan terletak jauh dari membran basal. Protein Vasa terekspresi kuat dan bisa digunakan sebagai marka sel germinal jantan pada fetus mencit jantan umur 13,5 dpc. Sementara itu, DAZL terekspresi kuat dan bisa digunakan sebagai marka spesifik untuk sel germinal jantan pada anak mencit jantan umur lima hari pascalahir.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan umur yang lebih beragam serta pelacakan gen atau protein yang lebih banyak untuk melihat dinamika ekspresi gen yang lebih menyeluruh pada perkembangan sel germinal jantan serta spermatogenesis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Keuangan Republik Indonesia melalui LPDP yang telah memberikan bantuan dana penelitian. Terima kasih juga kami sampaikan kepada Bapak Wahyudin, A.Md, laboran (PLT) di Laboratorium Embriologi SKHB IPB yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- De Miguel MP, Alcaina Y, de la Maza DS. 2018. Primordial Germ Cell Reprogramming. In: *Germ Cells*. Ahmed RG (ed). IntechOpen. Hlm. 43-72. DOI: 10.5772/intechopen.69965.
- Hayashi K, Saitou M. 2014. Perspective of germ cell development *in vitro* in mammals. *Anim Sci J* 85: 617-626. <https://doi.org/10.1111/asj.12199>.
- Moreno-Ortiz H, Esteban-Perez C, Badran W, Kent-First M. 2009. Isolation and derivation of mouse embryonic germ cells. *J Vis Exp* 32: 1635. <https://doi.org/10.3791/1635>.

- Ma C, Li J, Tao H, Lei B, Li Y, Tong K, Zhang X, Guan K, Shi Y, Li F. 2013. Discovery of two potential DAZL gene markers for sperm quality in boars by population association studies. *Anim Reprod Sci* 143(1-4): 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.002>.
- Nikolic A, Volarevic V, Amstrong L, Lako M, Stojkovic M. 2016. Primordial germ cells: current knowledge and perspective. *Stem Cells Int* ID: 1741072. <https://doi.org/10.1155/2016/1741072>.
- Prasetyaningtyas WE, Karja NWK, Agungpriyono S, Fahrudin M. 2019. Tingkat proliferasi primordial germ cells secara *in vitro* dalam medium kultur dengan penambahan leukemia inhibitory factor. *J Veteriner* 20(4): 526-533. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.4.526>
- Prasetyaningtyas WE, Karja NWK, Agungpriyono S, Fahrudin M. 2020. Characteristics of testicular cell development of 5-day-old mice in culture *in vitro*. *Anim Sci J* 91(1): e13332. <https://doi.org/10.1111/asj.13332>.
- Raz E. 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol* 1(3): Review1017. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017>.
- Sabour D, Araúzo-Bravo MJ, Hübner K, Ko K, Greber B, Gentile L, Stehling M, Schöler HR. 2011. Identification of genes specific to mouse primordial germ cells through dynamic global gene expression. *Hum Mol Genet* 20(1): 115-125. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq450>.
- Saitou M, Yamaji M. 2012. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a008375. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375>
- Shah SM, Saini N, Singh MK, Manik R, Singla SK, Palta P, Chauhan MS. 2016. Testicular cell-conditioned medium supports embryonic stem cell differentiation toward germ lineage and to spermatocyte- and oocyte-like cells. *Theriogenology* 86(3): 715-729. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.025>.
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. 2000. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14(7): 841-853. <https://doi.org/10.1101/gad.14.7.841>
- Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW, Carlson CA, Kolon TF, Ginsberg JP, Brinster RL. 2009. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(51): 21672-21677. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912432106>.
- Yön ND, Akbulut C. 2015. Identification of primordial germ cells: cytological, histological and immunohistochemical aspects. *Braz Arch Biol Technol* 58(2): 222-228. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500335>
- Zhao GQ, Garbers DL. 2002. Male germ cell specification and differentiation. *Dev Cell* 2: 537-547. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00173-9).