

FGF-9'un *In Vitro* Embriyonik Gelişim Üzerine Etkileri

The Effects of FGF-9 on *In Vitro* Embryonic Development

İlkim İlknur Tekinarslan, Erdoğan Unur, Harun Ülger, Nihat Ekinci, Tolga Ertekin, Mehtap Hacıoğulları, Seda Arslan

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Amaç: *In vitro* embriyo kültürü tekniği (9.5 ve 11.5 günlük embriyonik periyodu kapsar) büyüme faktörlerinin embriyo üzerindeki etkilerinin çalışılabilmesi için uygun bir metottur. Bu çalışmada, fibroblast growth factor-9'un (FGF-9) *in vitro* sıçan embriyosu gelişimi üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Wistar albino türü sıçanlardan eter anestezisi altında gebelik sürecinin 9,5'inci gününde embriyolar (her gebe sıçandan ortalama 10 embriyo) alındı. FGF-9'un embriyonik gelişim üzerine etkisini incelemek için her bir grupta 10 embriyo olmak üzere embriyolar 4 gruba bölündü. Kontrol grubunda (Grup I) kültür ortamı olarak sadece sıçan serumu kullanılırken Grup II-IV'ün kültüre edildiği sıçan serumuna ilave olarak ml başına sırası ile 1, 2 ve 4 µg anti-FGF-9 ilave edildi.

Bulgular: Toplam morfolojik skor kontrol grubunda 59.6 ± 0.51 iken deney gruplarında sırasıyla 43.7 ± 1.94 , 42.4 ± 13.52 ve 29.2 ± 10.97 olarak bulundu. Morfolojik skorlama sistemine göre toplam morfolojik skor, vitellus kesesi çapı, embriyo tepe-kıç uzunluğu ve somit sayısı karşılaştırıldığında deney gruplarında anlamlı bir gerilemenin olduğu tespit edildi.

Sonuç: Embriyonik dönemde organizma tarafından üretilen FGF-9'un eksikliğinde embriyonik gelişim olumsuz yönde etkilenmektedir.

Anahtar Sözcükler: Sıçan, *in vitro*, embriyo kültürü, FGF-9, anti FGF-9

Geliş tarihi: 12.05.2009

Kabul tarihi: 12.08.2009

ABSTRACT

Objective: *In vitro* embryo culture techniques that include between the 9,5th and 11,5th days of the embryonic period could be suitable for studying the effects of growth factors on the embryo. In this study, we aimed to investigate the effect of fibroblast growth factor-9 (FGF-9) on *in vitro* embryonic development in rats.

Material and Methods: The pregnant Wistar albino rats were killed by ether overdose at 9.5 days of gestation and the embryos (average of 10 embryos from each pregnant rat) were removed from the mother. In order to assess the effect of the FGF-9 on total embryonic growth, the embryos were divided into 4 groups. The control group (Group I) embryos were cultured in whole rat serum. Experimental groups (Group II-IV) were cultured in the presence of 1, 2 and 4 µg anti-FGF-9/per ml in whole rat serum.

Results: Total morphologic score in the control and Groups II-IV were 59.6 ± 0.51 , 43.7 ± 1.94 , 42.4 ± 13.52 and 29.2 ± 10.97 respectively. There was a significant regression in the research group in the total morphologic score, yolk sac diameter, crown-rump lengths and somite number when compared to the control group.

Conclusions: In the embryonic period, lack of FGF-9, which is produced by the embryo, could cause embryonic malformations.

Key Words: Rat, *in vitro*, embryonic culture, FGF-9, anti FGF-9

Received: 12.05.2009

Accepted: 12.08.2009

Giriş

Çok az miktarları bile hem *in vivo* ve hem de *in vitro* olarak hücre aktivitesini etkileyen protein karakterindeki maddelere büyüme faktörleri denir. Büyüme faktörleri fonksiyonlarını endokrin, otokrin veya parakrin mekanizmalarla sağlamaktadır. Farklı etkilere (angiogenezis, kemotaksis, hücre çoğalması, fibroblast göçü, yara iyileşmesi ve kollagen yapımı) sahip çok sayıda büyüme faktörü bulunmaktadır (1).

Büyüme faktörleri içerisinde üzerinde en çok çalışma yapılan grup Fibroblast Growth Factor (FGF) ailesidir. FGF ailesine ait ilk üye 1974 yılında izole edilmiştir (2). Günümüze kadar FGF ailesine mensup 23 üye tespit edilmiş olup bunların varlığı omurgalı ve omurgasız birçok canlıda gösterilmiştir (3). FGF'ler embriyonik ve fetal gelişimde, damarlanma,

yara iyileşmesi, doku oluşumu, yangı, sinirsel koruma, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hücre göçü, tümör gelişimi ve apoptosis gibi birçok önemli biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol almaktadır (4-6). FGF'ler heparin ve diğer anyonik moleküllere sıkıca bağlanan polipeptit ailesidir. Bu yüzden bazal membrana karşı yoğun bir affinite gösterir. FGF'ler biyolojik aktivitelerini Fibroblast Growth Factor Receptör (FGFR) ile gerçekleştirir. Şimdiye kadar 4 adet FGFR (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 ve FGFR-4) tespit edilmiştir (5).

Fibroblast Growth Factor-9 (FGF-9) ilk kez insan glioma hücre kültürlerinde keşfedildiği için glia aktivatör faktör (GAF) olarak da bilinir (3, 6). FGF-9 heparin bağlayan glikozlanmış tek bir zincirden ibaret olup ağırlığı 27-30 kDa arasındadır (7). FGF-9 özellikle FGFR-2 ve FGFR-3 ile bağlantı kurarken FGFR-1 ve FGFR-4 ile ilişkisi yoktur (8). İnsan ve sıçan dokuları üzerinde yapılan çalışmalar FGF-9'un merkezi sinir sisteminde bol olarak

Bu çalışma Uluslararası Katılımlı XII. Ulusal Anatomi Kongresi (29 Ekim-01 Kasım 2008 Mersin)'nde Sözlü Bildiri olarak sunulmuştur.

Address for Correspondence: Dr. Erdoğan Unur, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye
Phone: +90 352 437 49 10 E-mail: unur@erciyes.edu.tr

üretildiği (3), akciğer (4, 9), uterus (10), ve kemik gelişimi (11) üzerinde etkili olduğunu bildirmektedir.

Monoclonal antikorlar immünize hayvanlara ait farklı hücrelerin füzyonundan oluşan hibridomalardan elde edilmektedir. Immünogen olarak recombinant DNA'lar kullanılmaktadır. Monoclonal bir antikor olan Anti-FGF-9 uygun dozlarda verildiği takdirde *in vivo* ve *in vitro* şartlarda FGF-9'u bloke ederek onun biyolojik aktivitesini ortadan kaldırmaktadır (12).

New ve Stein (13) tarafından 1964 yılında ortaya konan ve daha sonra New (14) tarafından geliştirilen *in vitro* embriyo kültür tekniği, embriyonik gelişim sürecinde etkili olan faktörlerin ve mekanizmaların araştırılmasında, ilaçların embriyo gelişimi üzerine etkisinin tespitinde kullanılan bir yöntemdir (15, 16).

Deneyel çalışmalarda FGF'lerin *in vivo* ve *in vitro* kültür ortamlarında bloke edilmesi çeşitli gelişim bozukluklarına neden olmaktadır (5). Bu çalışmadaki amacımız embriyo kültür ortamına farklı dozlarda anti-FGF-9 ilave ederek FGF-9'un aktivitesini ortadan kaldırmak suretiyle embriyoda meydana gelebilecek gelişim bozukluklarını ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem

a) Embriyoların elde edilmesi: Çalışmamız Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Deneyel ve Klinik Araştırma Merkezinden temin edilen yaklaşık 8 haftalık 150-250 gr ağırlığındaki Wistar albino türü sıçanlardan 3 dişi ve 1 erkek saat 17.00'de aynı kafese kondu. Sabah saat 08.00'de erkek sıçanlar kafeslerden ayrıldı ve dışılarından vaginal smear alınarak mikroskopta incelendi. Smear'da sperm görülen iki yada üç sıçan ayrı bir kafese alınarak etiketlendi ve sıçanlar 0.5 günlük gebe kabul edildi (15-17).

Gebeliklerinin 9.5'inci gününde dişi sıçanların karın ön duvarı eter anestezisi altında açılarak içerisinde embriyo bulunan uterus keseleri Hanks dengeli tuz solusyonu bulunan petri kabına konuldu. Her bir gebe sıçandan yaklaşık 8-13 adet uterus konseptüsü alındı. Bundan sonraki aşamalar lamin-air flow kabinde, stero mikroskop altında ve forceps kullanılarak gerçekleştirildi. Uterus kas tabakası uzaklaştırılarak ortaya çıkarılan decidua ikiye ayrıldı. Embriyo bulunduğu decidua yarımından nazikçe çıkarıldı. Embriyo etrafında bulunan ve kemirgenlere has bir yapı olan Reicherts membranı embriyonal kutuptan yırtılarak çepeçevre ayrıldı. Böylece kültür ortamına konacak embriyolar elde edildi (14) (Resim 1 A-D).

Çalışmamızda toplam 8 adet dişi sıçandan elde edilen 80 embriyo eksplantasyon prosedürüne tabi tutuldu. Bu embriyolardan 15 tanesi iyi gelişmediği için, 25 tanesi ise diseksiyon esnasında yaralandığı için kültür ortamına konulmadı. Kalan 40 embriyo çalışmada kullanıldı.

b) Kültür ortamının hazırlanması: Eter anestezisi altında karın ön duvarı açılan sıçanların bağırsakları sağ tarafa yatırılarak pars abdominalis aortae'nın bifurkasyonundan steril bir enjektör yardımıyla kan alındı. Alınan kan 3500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum, protein inaktivasyonu için 56°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. 0.22 µm'lik filtreden süzülde. Serum içerisine kontaminasyonu engellemek için antibiyotik ilave edildi (14).

c) Deney gruplarının oluşturulması: Çalışmamızda 1 kontrol ve 3 deney grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu.

Kontrol grubuna ait embriyolar, embriyo başına 1ml sıçan serumu içinde kültüre edilirken (Her bir kültür şişesinde toplam 5 ml serum ve 5 embriyo), deney gruplarında embriyo başına 1ml normal sıçan serumuna 1 µgr (Grup II), 2 µgr (Grup III) ve 4 µgr (Grup IV), Anti-FGF-9 ilave edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlanarak kontrol ve deney gruplarında embriyo sayısı 10'a tamamlandı.

d) Embriyo kültür süreci: Kültür şişesine aktarılan embriyolar içerisinde %5 O₂, %5 CO₂ ve %90 N₂ bulunan gaz karışımı ile 1 dakika gazlandı. Ağız kapatılan kültür şişeleri 37°C'lik inkübatöre içerisinde dakikada yaklaşık 30 devirle dönen tüpler üzerine yerleştirildi. Eksplantasyondan 24 saat sonra kültür şişeleri inkübatörden alınarak içerisinde %20 O₂, %5 CO₂ ve %75 N₂ bulunan gaz karışımı ile 1 dakika gazlandı. Embriyolar morfolojik skorlamanın yapılacağı son gün ise 44. saatte (skorlamadan 4 saat önce) içerisinde %40 O₂, %5 CO₂ ve %55 N₂ bulunan gaz karışımı ile 1 dakika gazlandı. Üçüncü gazlamadan 4 saat sonra saat 13.00'de embriyolar kültür ortamından alınarak Van Maele-Fabry (18) ve ark. tarafından tanımlanan yöntemle göre skorlaması yapıldı.

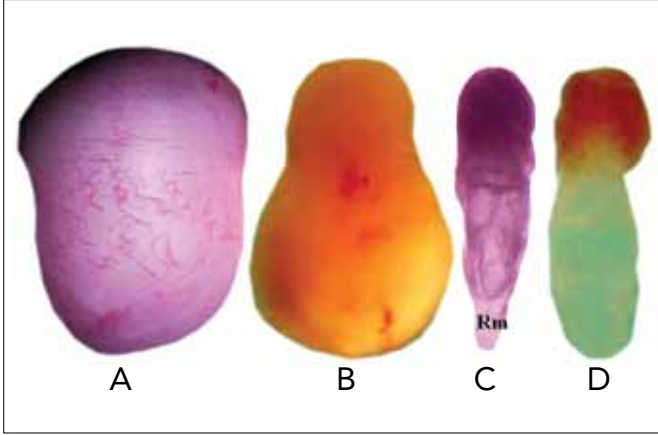
İstatistiksel olarak; 17 parametrenin toplanması ile elde edilen ve embriyo gelişimini içeren Toplam morfolojik skor (vitellus kesesi, allantois, vücut fleksiyonu, kalp gelişimi, neural tüp, ön beyin, orta beyin, arka beyin, göz, kulak, burun, yutak kavisleri, maksillar çıkıntı, mandibular çıkıntı, ön ayak tomurcuğu, arka ayak tomurcuğu ve somit sayısı), vitellus kesesi çapı, embriyonun tepe-kıç uzunluğu ve somit sayısı değerlendirildi.

Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Fark çıkan grupların çoklu karşılaştırmalarında Tukey Testi kullanıldı. Gruplardaki doz artışına bağlı olarak diğer değişkenlerin karşılaştırılmasında Spearman Korelasyon analizi kullanıldı. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

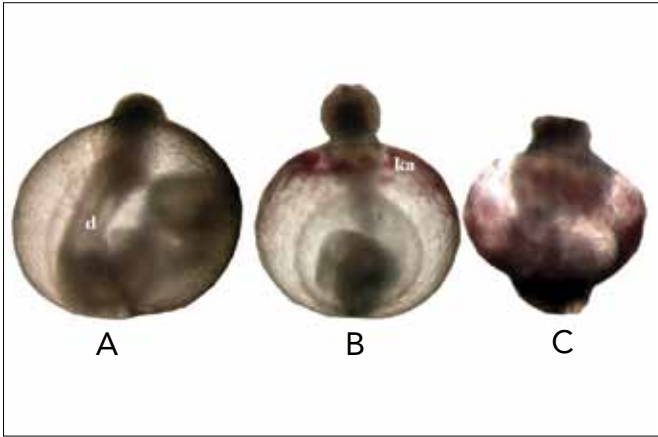
İncelememiz sonucunda vitellus kesesi damarlarının kontrol grubunda pleksus oluşturacak şekilde gelişim gösterdiği, deney gruplarında ise farklı düzeylerde kan adacıkları tespit edildi. Resim 2 A-C) Vitellus kesesine ait çap ölçümlerinde de kontrol ve deney grupları arasında doza bağlı olarak anlamlı farklar vardı (Tablo 1).

Kültürü yapılan embriyoların skorlama sonuçlarına göre kontrol grubuna ait embriyolarda 11.5 günlük normal embriyonik bir gelişim görülür iken farklı dozlarda (1, 2 ve 4µgr) anti-FGF-9 ilave edilerek oluşturulan deney gruplarına ait embriyolarda ise embriyonik gelişimde gerileme olduğu görüldü. Bu gerilemeye paralel olarak vitellus kesesi (yolk sac) damarlanmasında da gerileme mevcuttu. Vitellus kesesinden dışarı çıkarılan embriyolar üzerinde yapılan incelemede deney gruplarına ait embriyolarda vücut fleksiyonunun tamamlanmadığı, neural tüpün baş kısmında kapanmanın gerçekleşmediği, kulak tomurcuğu ve göz tomurcuğu'nda gerilemeler görüldü (Resim 3 A-C). Toplam morfolojik skora ait değerler kontrol grubunda 59.6±0.51 iken deney gruplarında sırasıyla 43.7±1.94, 42.4±13.52 ve 29.2±10.97 olarak bulundu (Tablo 1). Tepe-kıç uzunluğuna ve somit sayısına ait veriler Tablo 1'de görülmektedir. Tablodan da anlaşıldığı üzere kültür ortamına ilave edilen Anti-FGF-9'un miktarı arttıkça embriyo gelişimi daha yavaş olmaktadır.



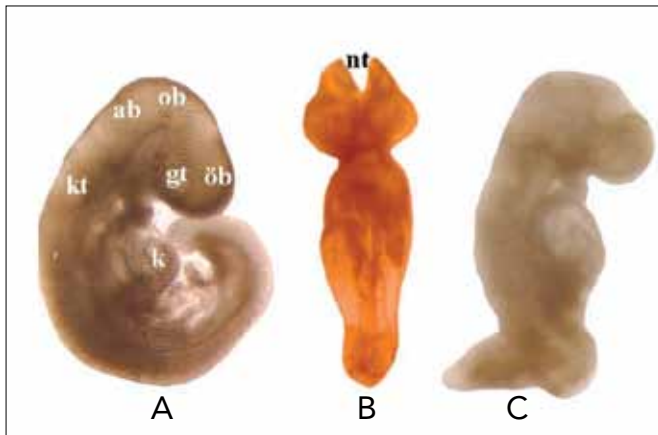
Resim 1. Kültüre edilecek embriyonun hazırlanması

A: İçerisinde embriyo bulunan uterus kesesi, B: İçerisinde embriyo bulunan decidua, C: Decidua'dan çıkarılan ve etrafında Reicherts membranı (RM) bulunan embriyo, D: Reicherts membranı ayrılmış kültüre edilecek embriyo



Resim 2. Vitellus kesesi içerisindeki embriyolar

A: Kontrol grubuna ait vitellus kesesinde damar (D) gelişimi bariz olarak görülmektedir, B: 2µgr Anti-FGF-9 ilave edilen deney grubunda kan adacıkları (KA) görülmektedir, C: 4µgr Anti-FGF-9 ilave edilen deney grubunda vitellus kesesinin şekil bozukluğu ve kan adacıkları görülmektedir



Resim 3. Vitellus kesesinden çıkarılmış embriyolar

A: Kontrol grubuna ait 11.5 günlük embriyo. Öb: Ön beyin, Ob: Orta beyin Ab: Arka beyin, Kt: Kulak tomurcuğu, Gt: Göz tomurcuğu, K: Kalp, B: 2µgr Anti-FGF-9 ilave edilen deney grubunda neural tüpü (nt) kapanmamış bir embriyo, C: 4µgr Anti-FGF-9 ilave edilen deney grubunda vücut

Çalışmadan elde edilen tüm değerler ve bunlar arasındaki istatistiksel ilişkiler Tablo 1'de toplu olarak sunulmuştur. Tablo da da görüldüğü üzere incelenen tüm değişkenlere ait ortalama değerler doz artışına bağlı olarak azalmaktadır.

Tartışma

Fibroblast büyüme faktörleri, nematodlardan insanlara kadar değişik organizmalarda bulunan bir polipeptid ailesi olup vertebralarda şimdiye kadar 23 üyesi tespit edilmiştir (4, 19). FGF'ler omurgalıların yaşam süreçlerinin farklı evrelerinde değişik roller üstlenmektedir (20-22). Glia aktivator faktör (GAF) olarak bilinen polipeptid zinciri ilk kez Miyamoto ve ark. (23) tarafından cDNA kodları tespit edildikten sonra fibroblast büyüme faktörlerine benzerliğinden dolayı FGF ailesinin 9. üyesi (FGF-9) olarak isimlendirilmiştir. FGF-9 208 aminoasit zincirinden oluşan bir protein olup FGF ailesinin diğer üyeleri ile %30 oranında benzerlik gösterir. Farklı canlılara ait FGF-9 yapıları %90'dan daha yüksek oranda yapısal benzerlikler göstermektedir (24, 25).

FGF-9, FGF ailesine mensup diğer üyeler gibi biyolojik süreçlerde oldukça etkilidir. Yetişkin dokularda potansiyel bir mitojen olarak görev yapar. Özellikle sinir hücrelerinin varlığının devamında önemli bir rol oynar (9). FGF-9'un kemik gelişiminde, merkezi sinir sisteminin aktivasyonunda, akciğer, testis, prostat, uterus ve ovaryum gelişiminde etkili olduğu bildirilmektedir (3, 7, 26). Çalışmada kullandığımız anti FGF-9 monoklonal özelliğe sahip (SIGMA Ürün kodu: F1672) sadece FGF-9 ile reaksiyona girer ve FGF-9'un biyolojik aktivitesini nötralize eder. FGF-9'un özelliklerini ve etkilerini anlamaya yönelik değişik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabilir.

Yaptığımız çalışmada, embriyoların gelişim düzeylerini değerlendirebilmek için Van Meale-Fabry ve arkadaşları (18) tarafından geliştirilen ve 17 ayrı parametre ihtiva eden toplam morfolojik skorlama yöntemini kullandık. Elde ettiğimiz veriler göstermektedir ki; normal sıçan serumunda kültüre edilen embriyoların gelişim düzeyleri *in vivo* şartlarda yetişen embriyolar ile büyük benzerlik göstermektedir. Farklı dozlarda anti FGF-9 ilave ettiğimiz kültür ortamında yetişen embriyolarda ise belirgin bir gelişim geriliği gözlemlendi. Bu gelişim düzeyindeki gerilemenin kültür ortamına ilave edilen anti FGF-9 miktarına bağlı olarak değiştiği ve en fazla gelişim gerilemesinin embriyo başına 4 µgr anti FGF-9 ilave ettiğimiz grupta olduğu tespit edildi. Kontrol grubuna ait morfolojik skor $59,6 \pm 0,51$ mm iken deney gruplarına (1, 2 ve 4 µgr anti FGF-9/ embriyo) ait değerler sırasıyla $43,7 \pm 1,94$, $42,4 \pm 13,52$ ve $29,2 \pm 10,97$ mm'dir.

Brown ve Fabro (27) yaptıkları çalışmada Yolc sac çapının 11.5 günlük embriyolarda $4,6 \pm 0,1$ mm olarak bildirilmektedir. Ulger ve Pratten (15) $3,35 \pm 0,06$ mm, Karabulut, Ulger, ve Pratten (28) $3,41 \pm 0,07$ mm olarak bildirmektedir. Çalışmamızda kontrol grubunda $5,6 \pm 0,37$ mm iken 4 µgr'lık grupta $4,7 \pm 0,17$ mm olarak tespit edildi.

Embriyo kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda 11.5 günlük sıçan embriyolarında kontrol gruplarına ait somit sayıları $25,5 \pm 0,8$ (28), $26,5 \pm 0,28$ (15, 17), $27,7 \pm 0,3$ (27), olarak bildirilmektedir. Çalışmamızda ise kontrol grubuna $21,2 \pm 2,04$ iken, 1, 2 ve 4 µgr'lık deney gruplarında sırasıyla $19,9 \pm 1,52$, $18 \pm 4,16$ ve $15,4 \pm 1,89$ olarak tespit edildi.

Tablo 1. Anti-FGF-9'un embriyonik büyüme ve gelişim üzerine etkisi

		Kontrol	1 µ/ embr	2 µ/ embr	4 µ/ embr	p
Toplam morfolojik skor	$\bar{X} \pm SS$	59.6±0.51	43.7±1.94	42.4±13.52	29.2±10.97	
	Ortanca	60 ^a	43.5 ^b	48.5 ^b	25.5 ^b	<0.001*
	Min-max	59-60	41-47	23-57	19-50	
Vitellus kesesi çapı	$\bar{X} \pm SS$	5.6±0.37	5.47±0.53	4.88±0.32	4.7±0.17	<0.005
	Ortanca	5.5 ^a	5.6 ^a	4.7 ^b	4.7 ^b	
	Min-max	5.72-6.25	4.78-6.17	4.60-5.50	4.50-5.20	
Tepe-Kiç uzunluğu	$\bar{X} \pm SS$	5.48±0.18	5.00±0.69	4.6±0.46	4.34±0.29	<0.005
	Ortanca	5.5 ^a	5.0 ^{ab}	4.5 ^b	4.4 ^b	
	Min-max	5.20-5.70	4.20-6.40	4.00-4.70	4.20-5.40	
Somit Sayısı	$\bar{X} \pm SS$	21.2±2.04	19.9±1.52	18.00±4.16	15.40±1.89	
	Ortanca	22 ^a	19 ^{ab}	18.50 ^{ab}	15.50 ^b	<0.001*
	Min-max	18-23	18-22	13-24	13-18	

^{a, b}: Fark çıkan grupları göstermektedir. Aynı harfin bulunduğu gruplarda fark yoktur, *: Buradaki p değeri <0.001 den daha küçüktür

Kültüre edilen 11.5 günlük sıçan embriyolarının tepe-kıç uzunluğu hakkında kaynaklarda 3.1 mm ile 3.8 mm arasında değişen rakamlar verilmektedir (14, 17, 28). Çalışmamızda ise kontrol grubu 5.4 iken 4 µgr'lık deney grubunda 4.6 olarak tespit edildi. Çalışmalar arasında görülen farklılıklar çalışmalarda kullanılan sıçan türlerinin farklılığından, çalışma ortamının farklılığından, çalışmayı ve skorlamayı yapan kişilerin farklılığından olabilir.

Anti FGF-9 ilave edilen sıçan serumunda kültüre edilen embriyoların gelişim düzeyleri normal sıçan serumunda kültüre edilen embriyolara göre gerilemektedir. Anti FGF-9'u kültür ortamına ilave ederek FGF-9'un nötralizasyonu gerçekleştirmek suretiyle yaptığımız bu çalışmada, anti FGF-9'un *in vitro* embriyo kültürü üzerindeki etkisini direkt olarak gözlerken aynı zamanda FGF-9'un embriyo gelişimi üzerindeki etkisini de dolaylı olarak inceleme imkanı bulduk.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Heath JK. Growth factors. Oxford: Oxford University Press; 1993.
2. McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. J Surg Res 1988;45:145-53. [CrossRef]
3. Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast growth factors in developing central nervous system. Clinical and Experimental Pharmacology 2001;28:493-503. [CrossRef]
4. Ortíz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. Genome Biology 2001;2:1-12.
5. Hossain WA, Morest DK. Fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2) promote migration and neurite growth of mouse cochlear ganglion cells in vitro: Immunohistochemistry and antibody perturbation. Journal of Neuroscience Research 2000;62:40-55. [CrossRef]
6. Powers C J, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Endocrine-Related Cancer 2000;7:165-97. [CrossRef]
7. Miyakawa K, Hatsuzawa K, Kurokawa T, Asada M, Kuroiwa T, Imamura T. A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. The Journal of Biological Chemistry 1999;274:29352-7.
8. Santos-Ocampo S, Colvin JS, Chellaiah A, Ornitz DM. Expression and biological activity of mouse fibroblast growth factor-9. The Journal of Biological Chemistry. 1996;271:1726-31. [CrossRef]
9. Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, Chuang PC, Wing LYC. Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. Endocrinology 2002;143:2715-21. [CrossRef]
10. Wing LYC, Chuang PC, Wu MH, Chen HM, Tsai SJ. Expression and mitogenic effect of fibroblast growth factor-9 in human endometrial implant is regulated by aberrant production of estrogen. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2003;88:5547-54. [CrossRef]
11. Govindarajan V, Overbeek PA. FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme. BMC Developmental Biology 2006;6:1-14. [CrossRef]
12. Matsumoto-Yoshitomi S, Kuroshima K, Nomura C, Habashita J, Kurokawa T. Construction of a sensitive enzyme immunoassay for human fibroblast growth factor 9. Hybridoma. 1996;15:299-305. [CrossRef]
13. New DAT, Stein KF. Cultivation of post-implantation mouse and rat embryos on plasma clots. J Embryol Exp Morphol 1964;12:101-11.
14. New DAT. Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1978;53:81-125. [CrossRef]
15. Ülger H, Pratten MK. The in vitro effects of low molecular weight serum fractions on embryonic wistar rat (*Rattus norvegicus*) development. Anat. Histol. Embryol 1999;28:265-9. [CrossRef]
16. Ülger H, Karabulut AK, Pratten MK. The growth promoting effects of bFGF, PD-ECGF and VEGF on cultured post-implantation rat embryos deprived of serum fractions. J. Anat. 2000;197:207-21. [CrossRef]
17. Ülger H, Özdamar S, Unur E, Pratten MK. The effect of vascular endothelial growth factor on in vitro embryonic heart development in rats. Anat. Histol. Embryol. 2004;33:334-8.
18. Van Maele-Fabry G, Delhaise F, Picard JJ. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryo. Toxicol. In Vitro 1990;4:149-56.
19. Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. Endocrine Reviews 2005;26:63-77.

20. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2005;16:159-78. [\[CrossRef\]](#)
21. Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:311-25. [\[CrossRef\]](#)
22. Dell'Era P, Ronca R, Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M. Fibroblast growth receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte Development. *Circulation Research* 2003;5:414-20. [\[CrossRef\]](#)
23. Miyomato M, Nauro KI, Seko C, Matsumoto S, Kondo T, Kurokawa T. Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Molecular and Cellular Biology*. 1993;13:4251-9.
24. Naruo KI, Seko C, Kuroshima KI, Matsutani E, Sasada R, Kondo T et al. Novel secretory heparin-binding factors from human glioma cells (glia-activating factors) involved in glial cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:2857-64.
25. Seo M, Noguchi K. Retinoic acid induces gene expression of fibroblast growth factor-9 during induction of neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Letters* 1995;370:231-5.
26. Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C, Salhab I, Koyama E, Leboy P et al. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: Differentiation stage- dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone* 2005;36:254-66.
27. Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: A morphological scoring system. *Teratology* 1981;24:65-78. [\[CrossRef\]](#)
28. Karabulut, AK, Ulger H, Pratten MK. Teratogenicity of endofoeron kappa A, a molecule derived from salicylate, in cultured rat embryos: Differences from salicylate and interaction with free oxygen radical scavenging enzymes. *Anat. Histol. Embryol.* 2000;29:363-70. [\[CrossRef\]](#)