

ERKEK ÜREME SİSTEMİ TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE DENEY HAYVANLARINA ALTERNATİF YÖNTEMLER

ALTERNATIVE METHODS USING EXPERIMENTAL ANIMALS IN ASSESSING MALE REPRODUCTIVE SYSTEM TOXICITY

Merve BAYSAL^{1*} , Abdullah Burak KARADUMAN¹ ,
Büşra KORKUT ÇELİKATEŞ¹ , Merve GÜVEN¹ 

¹Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Eczacılık Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu derleme kapsamında erkek üreme sistemi toksisitesi çalışmalarında kullanılan geleneksel *in vitro* yöntemler, yenilikçi *in vitro* modeller ile değerlendirme süreçlerine entegre edilen *in silico* yaklaşımlardan bahsedilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Erkek üreme sistemi toksisitesi, spermatogenezis süreci ve spermatozoon fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere neden olan ekzojen ve endojen faktörleri kapsar. Seminifer epitel, Leydig ve Sertoli hücreleri, epididimal spermatozoa olgunlaşması ve endokrin sistem bu süreçte temel hedeflerdir. Günümüzde üreme toksisitesinin değerlendirilmesi genellikle *in vivo* yöntemlerle gerçekleştirilmektedir; ancak bu yöntemler yüksek maliyetli, zaman alıcı ve etik açıdan tartışmalıdır. Alternatif yaklaşımlara duyulan ihtiyaç, özellikle Avrupa'daki düzenlemeler kapsamında vurgulanmış, deney hayvanı kullanımını azaltmaya yönelik çalışmaların önemini artırmıştır. Üreme sürecinin çok aşamalı ve hassas bir yapıya sahip olması, toksisite değerlendirmesini karmaşık hale getirmektedir. Kullanılan *in vivo* ve *in vitro* yöntemler toksik etkileri öngörme konusunda sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Daha iyi tasarlanmış, güvenilir modellere ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Erkek üreme sistemi toksisitesi, *in silico*, *in vitro*

ABSTRACT

Objective: This review discusses traditional *in vitro* methods used in male reproductive toxicity studies, innovative *in vitro* models, and *in silico* approaches integrated into toxicity assessment processes.

Result and Discussion: Male reproductive toxicity encompasses exogenous and endogenous factors that adversely affect spermatogenesis and sperm function. Key targets in this process include the seminiferous epithelium, Leydig and Sertoli cells, epididymal sperm maturation, and the endocrine system. Currently, the assessment of reproductive toxicity is predominantly conducted through *in vivo* methods; however, these approaches are costly, time-consuming, and ethically controversial. The need for alternative approaches has been particularly highlighted within the scope of regulations in Europe, increasing the importance of studies aimed at reducing the use of

* Sorumlu yazar: Merve Baysal

E-mail: mbaysal@anadolu.edu.tr

Geliş tarihi: 03.03.2025 Kabul tarihi: 29.06.2026 Yayınlanma tarihi: 19.09.2026

Atf bilgisi: Baysal, M., Karaduman, A.B., Korkut-ÇelİKATEŞ, B., Güven, M. (2026). Erkek üreme sistemi toksisitesinin değerlendirilmesinde deney hayvanlarına alternatif yöntemler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 50(3), 739-749.

experimental animals. The multi-stage and highly sensitive nature of the reproductive process complicates toxicity assessment, and both in vivo and in vitro methods have limited predictive capacity. Therefore, there is a pressing need for well-designed and reliable models.

Keywords: Male reproductive system toxicity, *in silico*, *in vitro*

GİRİŞ

Üreme toksisitesi (reproduktif toksisite), bir maddenin üreme döngüsünün herhangi bir aşamasında üreme fonksiyonlarının bozulmasına yol açma potansiyelini ifade eder. Bu kavram, embriyonik gelişimde büyüme geriliği, malformasyonlar ve ölüm gibi olumsuz etkileri de kapsar [1]. Erkek üreme sistemi toksisitesi ise ekzojen ve endojen faktörlerin seminifer epitel, spermatogenezis süreci, Leydig ve Sertoli hücreleri, epididimal spermatozoa olgunlaşması ve endokrin sistem gibi çoklu hedefler üzerindeki etkileriyle spermatozoa ve testislerde yapısal ve fonksiyonel bozulmalara yol açan durumları kapsar. Spermatozoa hareketliliği, konsantrasyonu, canlılığı ve sayısında azalma gibi sperma parametrelerindeki anormalliklerin yanı sıra artan DNA hasarı ve anormal morfoloji, testiküler hasarın göstergesi olarak kabul edilir [2,3].

Erkeklerin yaklaşık %7'sini etkileyen kısırlık olgularının %23'ü çeşitli patofizyolojik durumlardan kaynaklanmaktadır [4]. Bu duruma yol açan başlıca etkenler arasında ilaçlar, çevresel kirleticiler ve toksik maddelere mesleki maruziyet bulunmaktadır [5,6]. Ayrıca, mevcut üreme toksisitesi çalışmaları veritabanları üzerinde yapılan çeşitli analizler, testisin genellikle ekzojen maruziyetlere karşı en hassas organlardan biri olduğunu ve risk değerlendirmesinin başlangıç noktası olan en düşük gözlenen advers etki düzeyinin (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL) belirlenmesine olanak sağladığını göstermiştir. Bu nedenle testis, alternatif analizlerin geliştirilmesi için kesinlikle öncelikli bir organdır. Bu kapsamda, Ekonomik İş Birliği ve Kalkınma Teşkilatı (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) ve Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (International Conference on Harmonisation, ICH) test rehberleri hâlen büyük ölçüde hayvan verilerine dayansa da *in silico* ve *in vitro* alternatif yöntemler, tehlike ve risk değerlendirme süreçlerinde destekleyici ve tamamlayıcı yaklaşımlar olarak giderek daha fazla dikkate alınmaktadır [7].

İlaçların, yeni ve mevcut kimyasalların kaydı için klinik öncesi güvenlik değerlendirmesi zorunludur; ancak üreme toksisitesinin değerlendirilmesi için kullanılan mevcut *in vivo* yöntemler, çok sayıda hayvan kullanımını gerektirdiği gibi maliyetli ve zaman alıcı süreçlerdir [7-9]. Alternatif yöntemlere olan ihtiyacın farkındalığı, Avrupa'daki yeni kimyasal güvenlik mevzuatı ve Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, Yetkilendirilmesi ve Kısıtlanması (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals; REACH)'nın uygulanmasıyla artmıştır. Avrupa Kimyasallar Bürosu, çok nesilli çalışmalarda kullanılan yavruların sayılmasına dayanarak, REACH'e göre deney hayvanı kullanımının %65'inin yalnızca üreme ve gelişimsel toksisite değerlendirmesi için olacağını öngören tahmini veriler yayınlamıştır. Bu durum üreme toksisitesi ve gelişimsel toksikolojiyi alternatif yöntemler geliştirmek için yüksek öncelikli bir alan haline getirmektedir [7].

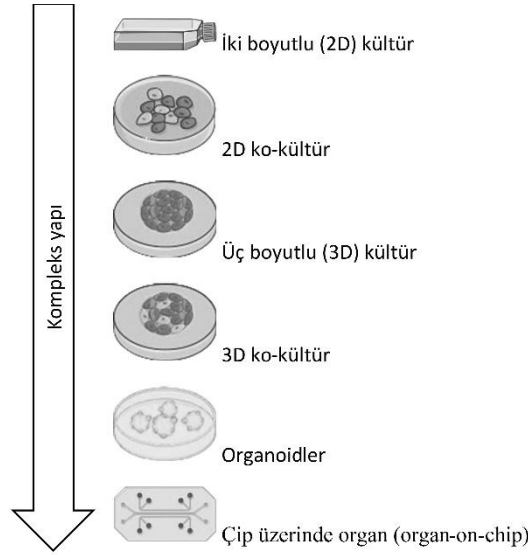
Bu derleme çalışmasında, erkek üreme toksisitesine yönelik araştırmalarda kullanılan hayvan alternatif yöntemler avantaj ve dezavantajlarıyla ele alınmış, ayrıca bu yöntemlerle yapılmış çalışmalardan örnekler sunulmuştur. *In vitro* ve *in silico* sistemler başlıkları altında anlatılan yöntemlerin toksisite belirlemede kullanıldığı, ancak testis içindeki karmaşık hücre-hücre iletişimini yansıtabilen; farklı ilaç moleküllerinin erken dönemde taranması ve toksik maddelerin etkilerinin incelenmesi için daha güvenilir modellere ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda, söz konusu eksiklikleri gidermeyi hedefleyen çalışmaların artan bir şekilde sürdüğü gözlenmiştir [4].

In Vitro Sistemler

Testis fonksiyonları, çeşitli hücre popülasyonlarına sahip olmaları nedeniyle birçok fizyolojik ve anatomik faktörden etkilenir. Spermatogenezis süreci, testis içindeki germ hücreleri ve Sertoli hücrelerini barındıran seminifer tübüllerde meydana gelir. Sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluşturarak çeşitli besinleri, hormonları ve büyüme faktörlerini seminifer tübüllere salgılar ve spermatogenezis sürecini düzenlemede önemli bir rol oynar. Leydig hücreleri ise testosteron veya endokrin faktörlerin birincil kaynağı olarak spermatogenezis sürecini destekler ve seminifer tübülleri

çevreleyen bağ dokusunda bulunur. Sertoli hücreleri, Leydig hücrelerinde steroidogenezi ve bu steroidlerin işlevlerini düzenleyen çeşitli faktörleri üretir [10]. Şu ana kadar, testis dokusundaki bu karmaşık yapının tamamını *in vitro* ortamda yeniden oluşturmak mümkün olmamıştır. Bu zorlukları daha yönetilebilir hale getirebilmek için araştırmacılar, inceledikleri testis hücre türlerinin sayısını sınırlamaktadır [7].

Testis toksisitesine ilişkin hipotezleri test etmek için Sertoli hücrelerinden zenginleştirilmiş kültürler, germ hücrelerinden zenginleştirilmiş kültürler, Leydig hücre kültürleri, Sertoli-germ hücre ko-kültürleri ile Leydig-Sertoli hücre ko-kültürleri gibi birçok sistem tanımlanmaktadır [11]. Bu amaçla daha çok kemirgen kökenli hücrelerin kullanıldığı görülmektedir. Kemirgen modelleriyle yapılan çalışmalar, testisin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yolları ve moleküler mekanizmalar hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ancak türler arası farklılıklar nedeniyle, testis gelişimi, fonksiyonu ve üreme bozukluklarının araştırılmasında insan testis dokuları veya hücrelerinin kullanıldığı deneysel yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır [12]. *In vitro* çalışmalarda insan kaynaklı hücrelerin de kullanılabilmesi, üreme üzerine toksik etkenleri daha iyi değerlendirebilecek, daha güvenilir modeller oluşturulmasına olanak sağlamaktadır [13]. *In vitro* sistemler Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. *In vitro* sistemler

İki Boyutlu (Two-Dimensional, 2D) ve Üç Boyutlu (Three-Dimensional, 3D) Kültürler

Hücre kültürleri, hücre davranışının *in vivo* koşullarda temelini oluşturan mekanizmaların daha iyi anlaşılması amacıyla yaygın olarak kullanılan *in vitro* yöntemlerdir. Geleneksel 2D hücre kültürü, hücrelerin genellikle cam veya polistiren petri kabı gibi düz bir yüzeye tutunarak mekanik destek sağlaması prensibine dayanır [14]. 2D kültürlerin avantajları arasında düşük maliyetleri ve kolay uygulanabilir test performansları gösterilebilir [15]. 2D kültür yöntemleri, testis biyolojisi ve toksikolojisi hakkında önemli bilgiler sağlasa da çoğu zaman organa özgü toksisiteyi tam olarak taklit edemez. Bu kültürler, genellikle sert ve düz yüzeylerde yetiştirildiğinden, hücrelerin doğal mimarisini değiştirerek uygun olmayan ve biyolojik açıdan alakasız hücre-hücre etkileşimlerine neden olabilir [16,17].

Üç boyutlu testis organoidleri, 2D kültür sistemleri ile hayvan modelleri arasında köprü niteliğinde birer platformdur. Bu organoidler, hücreler arası etkileşimleri, doku gelişimini ve morfogenez sürecini fizyolojiye daha uygun koşullarda incelemeye olanak tanır. Ayrıca, biyolojik açıdan daha anlamlı ve güvenilir sonuçlar sunarak ilaç ve toksisite taramalarının daha verimli yapılmasına imkân sağlarlar [4,10]. Ancak, 3D kültür tekniğinin kullanımı için gerekli olan özel ekipmanlar, bu yöntemin maliyetini önemli ölçüde artırmaktadır. Ayrıca, bu kültürlerin uygulanması

hem teknik açıdan bazı zorluklar içermekte hem de zaman alıcı bir süreç gerektirmektedir. Bu nedenle, bazı çalışmalar 3D kültürlerin belirli koşullarda 2D kültürler kadar verimli sonuçlar vermediğini göstermektedir [18]. Erkek üreme sistemi toksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılan modellere ait bazı örnekler Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. Erkek üreme sistemi toksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* modellere örnekler

Kullanılan <i>In Vitro</i> Sistem	Çalışmanın Amacı	Değerlendirilen Parametreler	Çalışmanın Sonucu	Referans
Leydig, Sertoli ve Germ Hücreleri Primer Kültür, 2d	Glifosat bazlı bir herbisitın sıçan testis hücrelerinde toksisitesinin değerlendirilmesi	Adenilat kinaz düzeyi Kaspaz 3/7 düzeyi DNA analizi 3 β -HSD aktivitesi Testosteron düzeyi Aromataz, androjen ve östrojen reseptörü α ve β ’nın mRNA ekspresyonu	Test edilen glifosat bazlı herbisit, olgun sıçan testis hücrelerinde nekroz ve apoptozu tetiklemiş; daha düşük konsantrasyonlarda testosteron düzeyini azaltmıştır.	[19]
Sertoli ve Leydig Hücreleri İle Spermatogonial Kök Hücreler Primer Kültür, Ölümsüzleştirilmiş Hücre Hatları (TM3 ve TM4), 2D	Gümüş nanopartiküllerin üreme toksisitesinin <i>in vitro</i> olarak değerlendirilmesi	Hücre canlılığı Reaktif oksijen türleri oluşumu Apoptoz nekroz oluşumu Nanopartiküllerin hücre içine alınması Metabolik aktivite, oksidatif stres, apoptoz ve steroidojenik süreçler ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin ifadesi ve protein düzeyleri	Test edilen nanopartiküller boyutlarına bağlı olarak erkek somatik hücrelerinde ve spermatogonial kök hücrelerinde toksisiteye neden olmuştur.	[20]
Sertoli ve Leydig Hücreleri İle Spermatogonial Kök Hücreler Primer Kültür, 3D	İnsan spermatogenezis süreci ve gonadotoksitesinin <i>in vitro</i> incelenmesi için yeni bir 3D testis organoid modelinin oluşturulması	Testis hücrelerinin ve organoidlerin karakterizasyonu Hücre canlılığı ve proliferasyonu Testosteron üretimi Somatik hücre fonksiyonel belirteçleri ve spermatogenezise özgü genlerin ifadesi Genişletilmiş kültür sırasında postmayotik germ hücre belirteçlerinin ifadesi Organoidlerin kriyoprezervasyonu ve canlılık değerlendirmesi Oluşturulan modelin, test maddelerinin toksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılması	Çalışmada oluşturulan 3D insan testis organoid sisteminin, yeni bir testis toksisitesi tarama aracı olma ve insan spermatogenezis süreci için <i>in vitro</i> model olarak kullanıma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.	[13]
Sertoli ve Germ Hücreleri Peritübüler Hücreler Primer Kültür, 3D	<i>In vivo</i> sıçan kan-testis bariyerinin kompozisyonunu, organizasyonunu, bariyer ve spermatogenezis fonksiyonlarını taklit eden bir <i>in vitro</i> model geliştirilmesi	Testis hücrelerinin ve organoidlerin karakterizasyonu Bariyer ve spermatogenezis fonksiyonlarının değerlendirilmesi (İmmüno Floresans boyama, elektron mikroskopu ile görüntüleme, ilgili gen ifadelerinin incelenmesi, trans-epitelyal elektriksel direncin ölçülmesi)	Geliştirilen modelin kan-testis bariyer toksisitesini incelemek için uygun bir model olabileceği ve kimyasalların erkek üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkilerinin tahmin edilmesine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir.	[21]
Leydig, Sertoli ve Spermatogonial Hücreleri Ölümsüzleştirilmiş Hücre Hatları (TM3, TM4 ve C18-4), 2D, 3D	Ölümsüzleştirilmiş hücre hatları ile <i>in vitro</i> 3D ko-kültür modelinin oluşturulması	Hücre morfolojisinin değerlendirilmesi (İmmünohistokimyasal incelemeler) Hücre canlılığı (Üreme üzerine toksik etkili 32 kimyasalın oluşturulan modelde değerlendirilmesi) Data bankalarından <i>in vivo</i> toksisite verilerinin incelenmesi ve elde edilen <i>in vitro</i> veriler ile karşılaştırılması	Oluşturulan modelin testis üzerine toksik etkili kimyasalların taranmasında kullanılabileceği bildirilmiştir.	[22]

Çalışmaların devam etmekte olmasına ve bu modellerin geliştirilmesine yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, mevcut *in vitro* testiküler modeller, *in vivo* ortamın biyolojik karmaşıklığını tam olarak yansıtamamakta; bileşiklerin metabolik dönüşümleri, testiküler dokunun doğal üç boyutlu yapısı, endokrin ve parakrin geri bildirim mekanizmaları, fizyolojik bariyerlerin varlığı ve insanla doğrudan korelasyon kurulabilmesi açısından hâlen önemli sınırlılıklar taşımaktadır [7].

Ko-Kültürler

Ko-kültür, iki veya daha fazla farklı hücre popülasyonunun bir dereceye kadar temas halinde birlikte yetiştirildiği bir hücre kültürü modelidir [23]. Araştırmanın amacına bağlı olarak, doğrudan temas ve dolaylı ko-kültür teknikleri de dahil olmak üzere farklı ko-kültür stratejileri benimsenmiştir. Doğrudan ko-kültür modelleri, iki hücre tipi arasında doğrudan temas yoluyla iletişimi sağlayan 2D veya 3D ko-kültür sistemlerini içerir. Dolaylı ko-kültür modelleri ise, iki hücre tipi arasında doğrudan teması engelleyen gözenekli membran ko-kültürü (Transwell), şartlandırılmış ortam ko-kültürü ve şartlandırılmış hücre dışı matriks ko-kültürünü içerir [24].

Hücreler arası iletişimi daha iyi anlamak için, *in vivo* mikro çevreyi taklit eden *in vitro* ko-kültür sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu sistemler, enfeksiyon hastalıkları, ilaç toksisitesi ve etkinliği, bağışıklık yanıtı ve kök hücre farklılaşması gibi süreçlerin incelenmesine katkı sağlar [24]. Ancak, ko-kültür çalışmaları karmaşık olup, detaylı optimizasyon gerektirir. Standartlaştırılmasının zorluğu ve hücreler arası etkileşimlerin öngörülemezliği, deney sonuçlarında değişkenliğe neden olabilir. Ayrıca, besin ve oksijen dağılımının kontrol edilmesindeki zorluklar, farklı hücre tipleri için optimal büyüme koşullarının sağlanmasını güçleştirebilir. Bunun yanı sıra, hücreler arasındaki etkileşimler spesifik hücresel yanıtların izole edilmesini zorlaştırabilir. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda, ko-kültür modelleri değerli araçlar olsa da deneysel tasarım ve optimizasyon süreçlerinde titizlikle değerlendirilmelidir [23,24].

Yapılan bir çalışmada fetal bovin serumu yerine nakavt serum ikamesi (knockout serum replacement, KSR) eklenerek geliştirilmiş bir 3D sıçan testis hücre ko-kültür modeli oluşturmuştur. Çalışmada KSR'nin hücre proliferasyonu ve germ hücre mayozunu artırdığının gözlenmesi, modelin fonksiyonel bütünlüğünü doğrulamıştır. Bisfenol A'nın model üzerindeki etkileri ise, modelin *in vivo* testis fizyolojisini başarılı şekilde taklit ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak, bu modelin testisteki kimyasal toksik etkileri ve etki mekanizmalarını incelemek için kullanılabileceği bildirilmiştir [25].

Bir diğer çalışmada germ, Leydig ve Sertoli hücreleri ile makrofajları içeren 3D testis ko-kültür sistemi oluşturulmuştur. Bu modelde makrofajların ve inflamatuvar olayların sürece dahil olduğu ve reproduktif toksik ajanlara maruz kalmanın bu süreçleri etkilediği gösterilmiştir. Modelin *in vivo* koşullarda testiste görülen inflamatuvar yollara benzer yanıtları belirlemede uygun olabileceği belirtilmiştir [26].

Çip Üzerinde Testis Modeli

Seminifer tübüllerin *in vivo* mikro çevresini taklit etmek için testis hücreleri kullanan karmaşık 3D yapılar geliştirmiştir [10]. Bu yapılardan birisi de "çip üzerinde testis (*testis-on-chip*)" modelidir. Bu model insan ve insana yakın primat testislerinden izole edilen seminifer tübüllerin *ex vivo* kültürü için geliştirilmiş bir çip üzerinde organ (*organ-on-chip*) sistemidir [27].

Çip üzerinde testis sistemi, özellikle spermatogenezis süreci ve testis fonksiyonlarını incelemek için kullanılan bir sistemdir. Bu model, hayvan deneylerine alternatif olarak kabul edilmekte ve kimyasal maddelerin erkek üreme fonksiyonu üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda toksisite testleri, hormon salınımı ve spermatogenezis sürecini etkileyen faktörlerin araştırılmasında da tercih edilmektedir [27].

Çip üzerinde organ teknolojisine ilişkin ilk çalışmalar 20. yüzyılın sonlarında yapılmıştır ve bu alandaki çalışmaların sayısının son yıllarda hızla artması, bu teknolojiyi giderek daha güçlü bir araç haline getirmektedir [28,29]. Özellikle ilaç geliştirme süreçlerinde, çip üzerinde organ sistemleri önemli avantajlar sunmaktadır [29]. Çip üzerinde organ sistemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2'de yer almaktadır.

Komeya ve ekibi, testis dokusunun uzun süreli *ex vivo* bakımı için mikro akışkan teknolojisi kullanarak çip üzerinde testis sistemi geliştirmiştir. Bu sistem, aralarında gözenekli poliüretan membran bulunan iki polidimetilsiloksan (PDMS) katmandan oluşmuştur. Gözenekli membran, kılcal damarlar ile çevre doku arasındaki ilişkiyi taklit etmiştir. Üst PDMS katmanında besleyici akışkan ortam kanalı, alt katmanda ise testis dokusunun yüklendiği bir doku haznesi vardır. Membran, dokuyu akışkan ortamdan ayırarak sürekli beslenmesini ve atık giderimini sağlamıştır. Bu sistemde testis dokusu 6 ay boyunca spermatogenezis süreci ve testosteron üretimini başarıyla sürdürmüştür [30].

Tablo 2. Çip üzerinde organ sistemlerinin avantajları ve dezavantajları [29]

Avantajlar	Dezavantajlar
İnsan hücreleri kullanımı, organların fizyolojik süreçlerini daha iyi yansıtır ve hayvan modellerinden kaynaklanan hataları azaltır.	Hücrelerin çip sistemleri üzerinde fonksiyonlarını sürdürmesi ve uygun bir mikro çevrede tutulmaları zor olabilir. Bu nedenle hücreler için uygun bir ortam sağlamak maliyetli ve teknik açıdan zor olabilir.
Hayvan deneylerini azaltabilir veya tamamen ikame edebilir.	Kullanılan bazı malzemeler, özellikle polidimetilsiloksan, ilaçları absorbe edebilir ve bu da deney sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.
Küçük boyutları sayesinde az miktarda ilaç kullanılarak çalışılabilir, bu da yüksek-verimli taramalar için uygundur.	
Biyosensörlerin entegre edilmesi ile hücre canlılığı ve fonksiyonları gerçek zamanlı olarak izlenebilir.	

Spermatogenezis sürecini incelemek için Park ve ekibinin yaptığı bir çalışmada çip platformu seminifer tübüllerin iki doku bölmesinden oluşmuştur: Sertoli bölmesi ve Leydig bölmesi. İnsan Sertoli ve Leydig hücreleri, doğal bir polimer karışımı ile çip üzerinde testis platformunun karşılık gelen bölmelerine yüklenmiştir. Ek olarak, Sertoli ve Leydig bölmeleri, çeşitli büyüme faktörleri, steroid hormonları ve endokrin faktörlerinin değişimi yoluyla aralarında karşılıklı endokrin etkileşimine izin veren damar hücresi kaplı iletişim kanalları ile birbirine bağlanmıştır. Ayrıca, iki bölmenin dış boşluğu, çeşitli endokrin veya endokrin olmayan hücre tipleriyle etkileşime giren vasküler endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleri (makrofajlar) ile yüklenmiştir. Bu sayede seminifer tübüllerdeki doğal mikro çevre de taklit edilmiştir [10].

Yapılan bir çalışmada çip üzerinde testis tasarımında çip, PDMS ile yapılmıştır. Ayrılmış testis hücreleri metilselüloz jelde süspanse edilerek merkez kanala ekilmiştir. Yanındaki kanallar daha yumuşak olan metilselüloz jelini tutmak için nispeten sert bir agar jeli içermiştir. En dıştaki kanallar, sürekli beslenme ve metabolik atıkların temizlenmesi için yer alan iletişim kanallarıdır. Daha kısa kılcak bariyer benzeri kanallar, dolum sırasında bir jelin komşu bir kanala taşmasını önlemiştir. Aynı çip üzerine akışkan olarak bağlanan ayrı kültür odaları ise çeşitli organoidlerin ortak kültürüne ve tutarlı büyüklükte organoidlerin oluşumuna olanak sağlamıştır [28].

Üç Boyutlu Biyo-Baskı

Üç boyutlu biyo-baskı (biyo-yazdırma), hücre yüklü biyomürekkeplerin 3D dijital modellerden fonksiyonel doku yapıları ve organlara dönüştürülmesi sürecidir [31]. İlk olarak 1990'larda tanımlanan 3D baskı, erkek üreme sisteminin tüm alanlarında giderek artan bir uygulama haline gelmiştir. Tıbbi kullanım için uygun organ ve doku modellerinin azlığı, 3D biyo-baskının ortaya çıkmasına neden olmuştur [32].

Erkek üreme fizyolojisinin spermatogenezis süreci ve spermatozoa canlılığının sürdürülmesi gibi temel süreçleri büyük ölçüde moleküler mikro çevreye bağlıdır. Büyüme faktörleri, hormonlar ve diğer biyofaktörler gibi doku mikroçevresini oluşturan unsurlar arasında, testis dokusunun homeostazındaki önemli rolü nedeniyle hücre dışı matrise (extracellular matrix, ECM) özellikle dikkat çekilmektedir. ECM, hücre ile hücre dışı ortam arasındaki etkileşimi artıran bir üç boyutluluk sağlar ve hücrenin ECM ve diğer ekzojen faktörlerden gelen moleküler sinyallere duyarlılığını artırır [33]. 3D biyo-baskı ile üretilen modeller zamanla canlı bir ortam oluşturmak için de kullanılmaya başlanmıştır. Hidrojellerden oluşan biyomürekkep yapısını kullanan bu modeller, büyük gözeneklere sahip olup, su ve besinleri çekerek hücresel yapışmayı ve ECM oluşumunu sağlamaktadır [34]. ECM türevi iskeletler, kök hücrelerle birlikte fonksiyonel organ üretimi için kullanılmaktadır. Hücresizleştirilmiş ECM'nin ise çeşitli doku ve organları yenilemek için biyolojik bir madde olarak kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [35].

Üç boyutlu biyo-baskı, tıp alanında özellikle doku mühendisliği ve rejeneratif terapiler için

önemli bir devrim potansiyeline sahiptir. Ancak, biyomürekkeplerin tasarımı ve karmaşık dokuların oluşturulmasında hâlâ zorluklar bulunmaktadır. *In vitro* çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilse de doku greftlerinin optimal uyumu ve fonksiyonelliği ile tam ölçekli organ nakli için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Klinik uygulamalarda, 3D biyo-baskı; materyal çözünürlüğü, yapısal bütünlük, doku rejenerasyonu ile uyumlu bozunma kinetikleri, hücre canlılığının korunması, hücre çoğalmasının artırılması ve toksisitenin azaltılması gibi çeşitli zorluklarla karşılaşmakta ve bu zorluklara yönelik çözümler geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu engellerin aşılması, biyo-baskının üreme dokusu mühendisliği gibi alanlardaki potansiyelini tam anlamıyla ortaya koyabilmesi açısından kritik öneme sahiptir [34].

Üç boyutlu biyo-baskıyı *in vitro* spermatozoa üretimi için kullanan Baert ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada, aljinat bazlı iskeletlerin 3D biyo-baskısı gerçekleştirilmiştir. Üretilen iskeletlerin biyo-baskısından sonra, testis hücreleri ile yapılan kültürlerde, kültürleme süresi sonunda yuvarlak ve uzun spermatid sayılarında farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu bulgu, oluşturulan modelin fizyolojik çalışmalarda ve ilaç tarama uygulamalarında faydalı olabileceğini göstermektedir [33].

Kök Hücre Bazlı Sistemler

Embriyonik kök hücre (EKH), doku germ katmanlarının oluşumundan önce erken embriyolardan elde edilen pluripotent kök hücre hatlarıdır [36]. Sınırsız çoğalma kapasitesi olan EKH'lere sahip modellemeler büyük ilgi uyandırmaktadır [37]. EKH, gen ifadesi ve moleküler sinyalleme düzeyinde ilkel germ hücreleri ile yüksek derecede benzerlik gösterir. Son çalışmalar EKH'nin kültürde ilkel germ hücrelerine ve spermatidlere farklılaştırılabileceğini ortaya koymaktadır. Fare ve insan EKH'si arasındaki farklar, *in vitro* toksisite tarama modellerinde insan kökenli çalışmanın daha uygun olduğunu düşündürmektedir [36]. Germ hücre gelişiminin insan EKH farklılaşma kültürlerinde incelendiği bir çalışmada, bu sürecin farklı aşamalarda üretilen mikroçevre tarafından düzenlendiği ve hücre-otonom bir mekanizma ile ilerlediği gösterilmiştir [38]. EKH hücrelerinden sperm üretiminin gösterilmesi, germ hücre gelişimini, epigenetik yeniden programlamayı ve germ hattı gen modifikasyonunu araştırmak için yeni olanaklar sunmuştur [39].

Son zamanlarda testis hücrelerini kullanan çalışmaların çoğu, spermatogonial kök hücrelerin (SKH) izole edilmesine odaklanmaktadır. Gelecek nesillere gen katkısında bulunma potansiyelleri olan bu hücreler, seminifer tübüllerin bazal zarında bulunan küçük bir testis hücre grubudur. SKH'lerin spermatogenezis sürecini başlatmadaki işlevsellikleri ve EKH'ye alternatif olarak kullanım için pluripotensiteye yönlendirilme potansiyelleri ile ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca bu tür kültür sistemleri, infertil yetişkin hastaların testislerinden izole edilen farklılaşmamış germ hücrelerinden veya gonadotoksik tedavi uygulanmadan önce ergenlik öncesi kanser hastalarından toplanan testis biyopsilerinden haploid erkek germ hücreleri üretmek için potansiyel olarak kullanılmaktadır [40-42]. He ve arkadaşlarının insan spermatogonyumunu izole etmek, saflaştırmak, karakterini belirlemek ve kültürlemek için yaptığı bir çalışmada insandaki farklılaşmamış spermatogonyumun uzun süre boyunca *in vitro* muhafaza edilebileceği gösterilmiştir [43]. İnsan SKH izolasyonunun, *in vitro* kültürlerin kurulumu için standartlaştırılmış bir protokol geliştirilmesinde ve bu alandaki ilerlemenin sağlanmasında önemli bir adım olacağı düşünülmektedir [44].

Bununla birlikte, SKH'ler üzerine yapılan araştırmalar, ekonomik açıdan pahalı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Klinik uygulamaların artması için germ hattı kök hücre teknolojisinin daha da geliştirilmesi gerekmektedir [45]. Son zamanlardaki önemli çalışmalara rağmen, kök hücrelerin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını yöneten düzenleyici mekanizmalarla ilgili bilgiler hala sınırlıdır. Daha fazla genin sürece dahil olmasının, keşfedilmesi gereken yeni alanların ortaya çıkmasına neden olacağı düşünülmektedir [46].

In Silico Sistemler

In silico toksikoloji, kimyasalların insan sağlığına olan olumsuz etkilerini tahmin etmek için çeşitli veri kaynaklarını bir araya getiren hesaplamalı bir yöntemdir. Bu yaklaşım, geleneksel toksisite testlerine alternatif olarak, toksisite tahminleri, kimyasal önceliklendirme ve ilaç geliştirme süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır [47,48].

In vivo testlerin kullanımı yerine alternatif toksisite değerlendirme yöntemlerinin uygulanması

gerek hayvan refahı düşünüldüğünde gerek maliyet-fayda analizi yapıldığında etik ve ekonomik açıdan daha avantajlıdır [6,49]. Bu noktada deneysel yaklaşımlara alternatif olarak toksisite değerlendirme yöntemlerinden *in silico* metotlar devreye girmektedir. *In silico* metotlar çoklu kimyasal analizinde üreme üzerine olası olumsuz etki yaratabilecek kimyasalları belirlemek için hızlı ve ucuz bir tarama platformu sunmaktadır [6]. Toksikoloji temelli hesaplama yaklaşımları tipik olarak toksisite veri tabanları, nicel yapı-etkinlik ilişkisi (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) modellemesi, insan kuralı temelli yöntemler, tanımlayıcı temelli yöntemler ile ligand ve hedef temelli yöntemler oluşturmayı amaçlamaktadır [50].

Matthews ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, deneysel genotoksik ve reprotoksik verileriyle birleştirilmiş geniş kapsamlı *in silico* veri setleri kullanılarak, karsinojen maddeleri tanımlamak için yeni bir yöntem incelenmiştir. Fare karsinojenik biyoanaliz sonuçlarına göre oluşturulan modüller, karsinojenik olup da genotoksik veya reprotoksik verileri eksik olan 1442 kimyasalın aktivitesini tahmin etmek için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda geliştirilen modeller, deneysel verilerle yüksek oranda uyumlu sonuçlar vermiş ve *in silico* yöntemlerin, genetik toksinler, reprotoksikler ve karsinojenleri tanımlamak için etkili bir araç olduğunu göstermiştir [51].

Feng ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada ise kimyasalların üreme toksisitesini tahmin etmek için hayvan deneylerinin yerini alabilecek topluluk öğrenmesi (ensemble learning) modelleri geliştirilmiştir. 1823 kimyasalı içeren bir veri seti üzerinde, destek vektör makineleri, rassal orman (random forest) ve aşırı gradient artırma (extreme gradient boosting) yöntemleri kullanılarak 9 moleküler parmak izi ile modeller oluşturulmuş ve geliştirdikleri Ensemble-Top12 modelinin daha yüksek doğruluk, özgüllük ve eğri altındaki alan değerleri sağladığı görülmüştür. Ayrıca reproduktif toksisiteyle ilişkili bazı parmak izi özellikleri de tespit edilmiştir [52].

315 pestisit için mevcut *in silico* modellerin üreme ve gelişim toksisitesi tahminleri değerlendirilen bir diğer çalışma da Weyrich ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. VEGA, OECD QSAR Toolbox, Leadscape Model Applier ve CASE Ultra modelleri incelenmiş ve genel olarak tahminler yalnızca nadir durumlarda anlamlı bulunmuş ve her zaman bir uzman tarafından değerlendirilmesi gerekliliği vurgulanmıştır [53].

In silico üreme sistemi toksisite çalışmaları, yeni ilaç adaylarının güvenlik değerlendirmesi sürecinde zaman ve maliyet açısından önemli tasarruflar sağlayabilmektedir. Üreme sistemi toksisitesi riskinin erken aşamalarda belirlenmesine olanak tanıyarak, toksik bileşiklerin geliştirme sürecinden elenmesine katkıda bulunabilmektedir. Bu yöntem, kimyasal güvenlik değerlendirmeleri ve çevre koruma alanlarında önemli bir araç olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır [54]. Ayrıca, gelecekte gerçekleştirilecek *in vitro* ve *in vivo* deneylerde izlenebilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi için potansiyel bir temel oluşturabilir [55]. Bu avantajların yanında *in silico* reproduktif toksisite çalışmalarının bazı kısıtlamaları da bulunmaktadır. Kimyasalların üreme ve gelişimsel etkilerini incelemek için geliştirilen test yönergelerinin karmaşıklığı, toksisitenin değerlendirilmesiyle ilişkili yapısal dismorfojeniz, visceral organ toksisitesi, immünolojik mekanizmalar gibi birçok olası toksik etki mekanizmasının varlığı *in silico* yaklaşımları da karmaşık bir süreç haline getirmektedir. Buna ek olarak, *in silico* model ve tahminlerin güvenilirliğinin deneysel verilere dayandığı göz önüne alındığında görece az sayıda reproduktif deneysel verinin olması ayrıca bir sorun teşkil etmektedir [56].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Erkek üreme sistemi toksisitesi, semifer epitelyumu ve spermatogenez sürecini destekleyen Leydig ve Sertoli hücrelerinin hedef alınması, epididimal spermatozoa olgunlaşmasının bozulması ve endokrin sistemin etkilenmesi gibi mekanizmaları kapsamaktadır [3]. *In vitro* spermatogenez sürecine yönelik mevcut yaklaşımlar organ/doku kültürü, 2D ve 3D hücre kültürünü içermektedir [44]. Deneysel yaklaşımlara ek olarak, toksisite değerlendirme süreçlerinde alternatif bir yöntem olarak *in silico* metotlar da kullanılmaktadır.

Üremenin birçok farklı süreç ve hassas dönemlerle karakterize olması, döngü üzerindeki toksik etkilerin test edilmesini karmaşık hale getirmektedir [57]. İlaç ve ilaç dışı kimyasal maddelerin toksisite profillerinin belirlenmesinde maliyetin düşürülmesi ve deney hayvanı kullanımının azaltılması açısından, tarama ile yüksek riskli kimyasalların belirlenmesi adına iyi tasarlanmış *in vitro* modellere

ihtiyaç duyulmaktadır [7]. Bu amaçla devam eden çalışmalarda alternatif modellerin geliştirilmesiyle üreme toksisitesinin daha verimli ve etik açıdan sürdürülebilir bir şekilde incelenmesi ile insan sağlığı üzerindeki potansiyel risklerde öngörünün iyileştirilmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışma kapsamında yazarların öngörüsüne göre, alternatif yaklaşımlar kısa ve orta vadede hayvan deneylerinin tam ikamesi olmaktan ziyade, *in silico* ve *in vitro* yöntemlerin entegre edildiği hibrit değerlendirme stratejileri aracılığıyla üreme toksisitesinin daha güçlü ve güvenilir biçimde öngörülmesine katkı sağlayacaktır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.B.; Tasarım: M.B.; Denetim: M.B.; Kaynaklar: - ; Malzemeler: - ; Veri Toplama ve/veya İşleme: - ; Analiz ve/veya Yorumlama: M.B., A.B.K., B.K.Ç., M.G.; Literatür Taraması: M.B., A.B.K., B.K.Ç., M.G.; Makalenin Yazılması: M.B., A.B.K., B.K.Ç., M.G.; Kritik İnceleme: M.B., A.B.K., B.K.Ç., M.G.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Sullivan, F.M. (1995). The European Community directive on the classification and labeling of chemicals for reproductive toxicity. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 37(8), 966.
2. Panga, J., Zhao, Y. (2024). Male reproductive toxicity of antifouling chemicals: Insights into oxidative stress-induced infertility and molecular mechanisms of zinc pyrithione (ZPT). *Antioxidants*, 13(2), 173. [\[CrossRef\]](#)
3. Mantovani, A., Maranghi, F. (2005). Risk assessment of chemicals potentially affecting male fertility. *Contraception*, 72(4), 308-313. [\[CrossRef\]](#)
4. Sakib, S., Voigt, A., Goldsmith, T., et al. (2019). Three-dimensional testicular organoids as novel *in vitro* models of testicular biology and toxicology. *Environmental Epigenetics*, 5(3), dvz011. [\[CrossRef\]](#)
5. Lawson, C.C., Schnorr, T.M., Daston, G.P., et al. (2003). An occupational reproductive research agenda for the third millennium. *Environmental Health Perspectives*, 111(4), 584-592. [\[CrossRef\]](#)
6. Jiang, C., Yang, H., Di, P., et al. (2019). *In silico* prediction of chemical reproductive toxicity using machine learning. *Journal of Applied Toxicology*, 39(6), 844-854. [\[CrossRef\]](#)
7. Saldutti, L., Beyer, B.K., Breslin, W., et al. (2013). *In vitro* testicular toxicity models: Opportunities for advancement via biomedical engineering techniques. *ALTEX*, 30(3), 353-377. [\[CrossRef\]](#)
8. Tornqvist, E., Annas, A., Granath, B., et al. (2014). Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One*, 9, e101638. [\[CrossRef\]](#)
9. Beekhuijzen, M. (2017). The era of 3Rs implementation in developmental and reproductive toxicity (DART) testing: Current overview and future perspectives. *Reproductive Toxicology*, 72, 86-96. [\[CrossRef\]](#)
10. Park, S.R., Kook, M.G., Kim, et al. (2024). Development of a novel testis-on-a-chip that demonstrates reciprocal crosstalk between Sertoli and Leydig cells in testicular tissue. *Experimental & Molecular Medicine*, 56, 1591-1605. [\[CrossRef\]](#)
11. Lamb, J.C., Chapin, R.E. (1993). Testicular and germ cell toxicity: *In vitro* approaches. *Reproductive Toxicology*, 7(Suppl 1), 17-22. [\[CrossRef\]](#)
12. Tharmalingam, M.D., Jorgensen, A., Mitchell, R.T. (2018). Experimental models of testicular development and function using human tissue and cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 468, 95-110. [\[CrossRef\]](#)
13. Pendergraft, S.S., Sadri-Ardekani, H., Atala, A., et al. (2017). Three-dimensional testicular organoid: A novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 96(3), 720-732. [\[CrossRef\]](#)
14. Duval, K., Grover, H., Han, L.H., et al. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 32(4), 266-277. [\[CrossRef\]](#)
15. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, et al. (2018). 2D and 3D cell cultures- a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910-919. [\[CrossRef\]](#)

16. Baker, B.M., Chen, C.S. (2012). Deconstructing the third dimension: How 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, 125, 3015-3024. [\[CrossRef\]](#)
17. Brevini, T.A., Pennarossa, G., Gandolfi, F. (2020). A 3D approach to reproduction. *Theriogenology*, 150, 2-7. [\[CrossRef\]](#)
18. Bedard, P., Gauvin, S., Ferland, K., et al. (2020). Innovative human three-dimensional tissue-engineered models as an alternative to animal testing. *Bioengineering*, 7(3), 115. [\[CrossRef\]](#)
19. Clair, E., Mesnage, R., Travert, C., et al. (2012). A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 26(2), 269-279. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhang, X.F., Choi, Y.J., Han, J.W., et al. (2015). Differential nanoreprotoxicity of silver nanoparticles in male somatic cells and spermatogonial stem cells. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1335-1357. [\[CrossRef\]](#)
21. Legendre, A., Froment, P., Desmots, S., et al. (2010). An engineered 3D blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. *Biomaterials*, 31(16), 4492-4505. [\[CrossRef\]](#)
22. Yin, L., Wei, H., Liang, S., et al. (2017). From the cover: An animal-free *in vitro* three-dimensional testicular cell coculture model for evaluating male reproductive toxicants. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 159(2), 307-326. [\[CrossRef\]](#)
23. Goers, L., Freemont, P., Polizzi, K.M. (2014). Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(96), 20140065. [\[CrossRef\]](#)
24. Yoo, J., Jung, Y., Char, K., et al. (2023). Advances in cell coculture membranes recapitulating *in vivo* microenvironments. *Trends in Biotechnology*, 41(2), 214-227. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang, X., Wang, L., Zhang, X., et al. (2017). The use of KnockOut serum replacement (KSR) in three-dimensional rat testicular cells co-culture model: An improved male reproductive toxicity testing system. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 106(Pt A), 487-495. [\[CrossRef\]](#)
26. Harris, S., Shubin, S.P., Wegner, S., et al. (2016). The presence of macrophages and inflammatory responses in an *in vitro* testicular co-culture model of male reproductive development enhance relevance to *in vivo* conditions. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 36, 210-215. [\[CrossRef\]](#)
27. Sharma, S., Venzac, B., Burgers, T., et al. (2022). Testis-on-chip platform to study *ex vivo* primate spermatogenesis and endocrine dynamics. *Organs-on-a-Chip*, 4, 100023. [\[CrossRef\]](#)
28. Shuchat, S., Yossifon, G., Huleihel, M. (2022). Perfusion in organ-on-chip models and its applicability to the replication of spermatogenesis *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5402. [\[CrossRef\]](#)
29. Beißner, N., Reichl, S., Lorenz, T. (2016). Organ-on-chip. In S. van den Driesche, C. Ehrhardt (Eds.), *Micro systems for pharmatechnology*, Springer, 299-339. [\[CrossRef\]](#)
30. Komeya, M., Kimura, H., Nakamura, H., et al. (2016). Long-term *ex vivo* maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Scientific Reports*, 6, 21472. [\[CrossRef\]](#)
31. Vijayavenkataraman, S., Yan, W.C., Lu, W.F., et al. (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 296-332. [\[CrossRef\]](#)
32. Zhao, Y., Liu, Y., Dai, Y., et al. (2022). Application of 3D bioprinting in urology. *Micromachines*, 13(7), 1073. [\[CrossRef\]](#)
33. Horvath-Pereira, B.O., Almeida, G.H.D.R., da Silva Júnior, L.N., et al. (2023). Biomaterials for testicular bioengineering: How far have we come and where do we have to go? *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1085872. [\[CrossRef\]](#)
34. Aydin, S., Yaşı, M., Yildiz, Ş., et al. (2024). Advancements in three-dimensional bioprinting for reproductive medicine: A systematic review. *Reproductive Biomedicine Online*, 49(4), 104273. [\[CrossRef\]](#)
35. Scarritt, M.E., Pashos, N.C., Bunnell, B.A. (2015). A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 43. [\[CrossRef\]](#)
36. Krtolica, A., Giritharan, G. (2010). Use of human embryonic stem cell-based models for male reproductive toxicity screening. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(3), 213-221. [\[CrossRef\]](#)
37. Kleinstreuer, N.C., Smith, A.M., West, P.R., et al. (2011). Identifying developmental toxicity pathways for a subset of ToxCast chemicals using human embryonic stem cells and metabolomics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 257(1), 111-121. [\[CrossRef\]](#)
38. Clark, A.T., Bodnar, M.S., Fox, M., et al. (2004). Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Human Molecular Genetics*, 13(7), 727-739. [\[CrossRef\]](#)
39. Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., et al. (2006). *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Developmental Cell*, 11(1), 125-132. [\[CrossRef\]](#)

40. Russell, L.D., Ettlin, R.A., Hikim, A.P.S., et al. (1993). Histological and histopathological evaluation of the testis. *International Journal of Andrology*, 16, 83. [\[CrossRef\]](#)
41. Martin, L.A., Seandel, M. (2013). Propagation of adult SSCs: From mouse to human. *Biomedical Research International*, 2013, 384734. [\[CrossRef\]](#)
42. Sanou, I., van Maaren, J., Eliveld, J., et al. (2022). Spermatogonial stem cell-based therapies: Taking preclinical research to the next level. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 850219. [\[CrossRef\]](#)
43. He, Z., Kokkinaki, M., Jiang, J., et al. (2010). Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biology of Reproduction*, 82(2), 363-372. [\[CrossRef\]](#)
44. Ibtisham, F., Honaramooz, A. (2020). Spermatogonial stem cells for *in vitro* spermatogenesis and *in vivo* restoration of fertility. *Cells*, 9(3), 745. [\[CrossRef\]](#)
45. Zhang, R., Sun, J., Zou, K. (2016). Advances in isolation methods for spermatogonial stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(1), 15-25. [\[CrossRef\]](#)
46. Aponte, P.M., van Bragt, M.P., de Rooij, D.G., et al. (2005). Spermatogonial stem cells: Characteristics and experimental possibilities. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 113(11-12), 727-742. [\[CrossRef\]](#)
47. Kavlock, R.J., Ankley, G., Blancato, J., et al. (2008). Computational toxicology-A state of the science mini review. *Toxicological Sciences*, 103(1), 14-27. [\[CrossRef\]](#)
48. Sarigiannis, D.A., Stratidakis, A.K., Karakitsios, S.P. (2024). *In Silico Methods and In Silico Toxicology*. Ed: Wexler, P. *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, New York, 503-507. [\[CrossRef\]](#)
49. Casey, W., Jacobs, A., Maull, E., et al. (2015). A new path forward: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and National Toxicology Program's Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2), 170-173.
50. Valerio, L.G., Jr. (2009). *In silico* toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241(3), 356-370. [\[CrossRef\]](#)
51. Matthews, E.J., Kruhlak, N.L., Cimino, M.C., et al. (2006). An analysis of genetic toxicity, reproductive and developmental toxicity, and carcinogenicity data: II. Identification of genotoxicants, reprotoxicants, and carcinogens using *in silico* methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(2), 97-110. [\[CrossRef\]](#)
52. Feng, H., Zhang, L., Li, S., et al. (2021). Predicting the reproductive toxicity of chemicals using ensemble learning methods and molecular fingerprints. *Toxicology Letters*, 340, 4-14. [\[CrossRef\]](#)
53. Weyrich, A., Joel, M., Lewin, G., et al. (2022). Review of the state of science and evaluation of currently available *in silico* prediction models for reproductive and developmental toxicity: A case study on pesticides. *Birth Defects Research*, 114(14), 812-842. [\[CrossRef\]](#)
54. Zhang, H., Shen, C., Liu, R., et al. (2020). Developing novel *in silico* prediction models for assessing chemical reproductive toxicity using the naïve Bayes classifier method. *Journal of Applied Toxicology*, 40(9), 1198-1209. [\[CrossRef\]](#)
55. Stojilković, N., Radović, B., Vukelić, D., et al. (2023). Involvement of toxic metals and PCBs mixture in the thyroid and male reproductive toxicity: *In silico* toxicogenomic data mining. *Environmental Research*, 238, 117274. [\[CrossRef\]](#)
56. Marzo, M., Roncaglioni, A., Kulkarni, S., et al. (2022). *In Silico Models for Developmental Toxicity*. Ed: Benfenati E. *In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity*, 2425, Humana Press, New York, 217-240. [\[CrossRef\]](#)
57. Luijten, M., de Vries, A., Opperhuizen, A., et al. (2008). Alternative methods in reproductive toxicity testing: State of the art. RIVM Report 340720002.