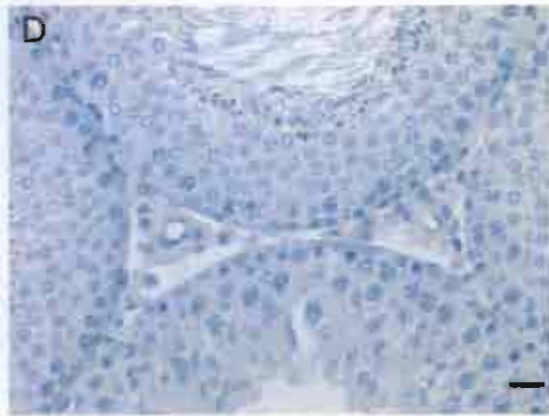
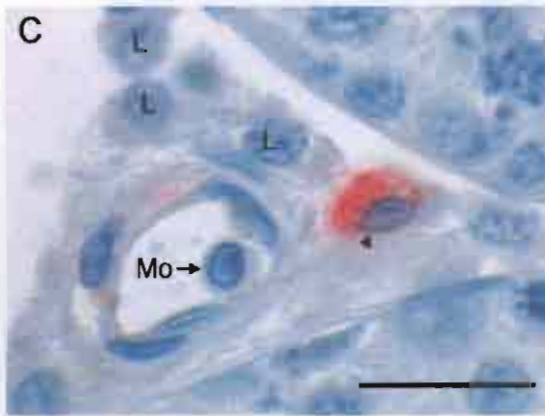
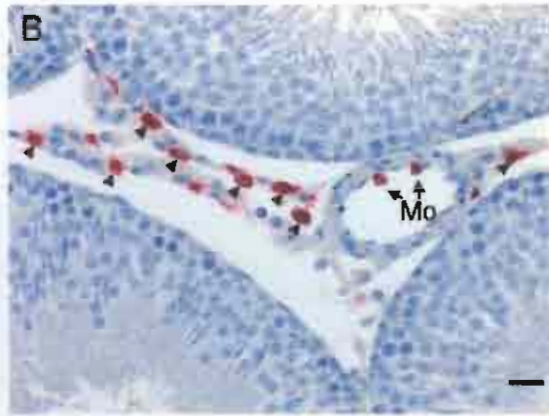
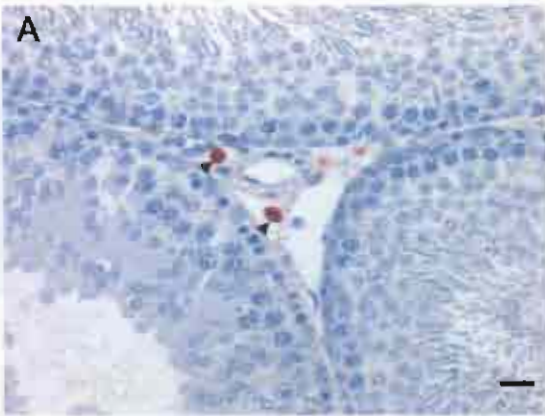
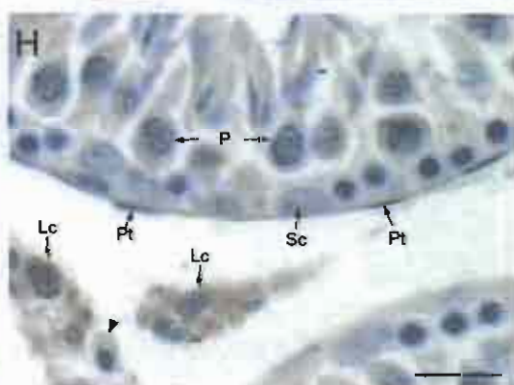
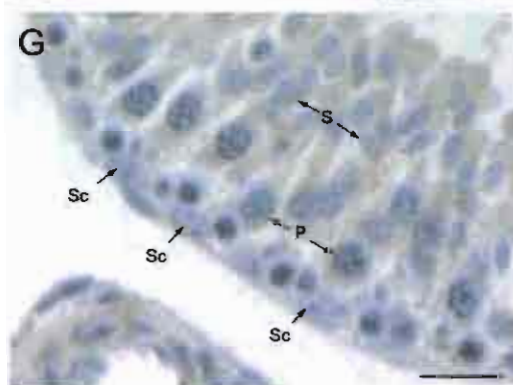
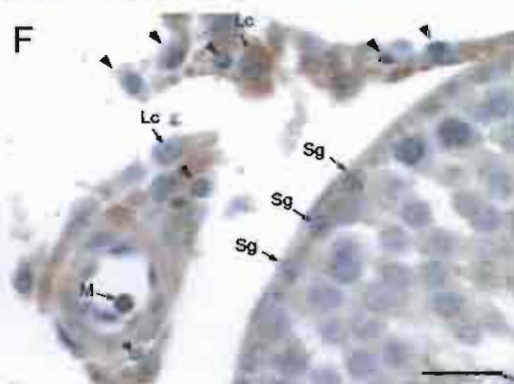
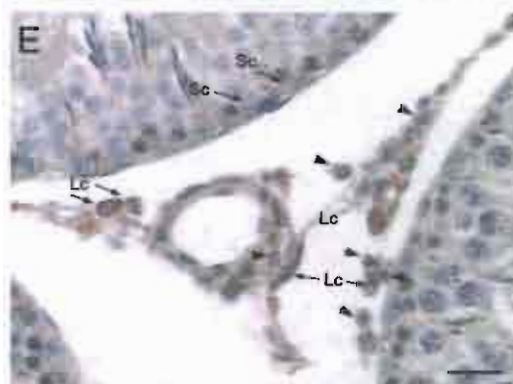
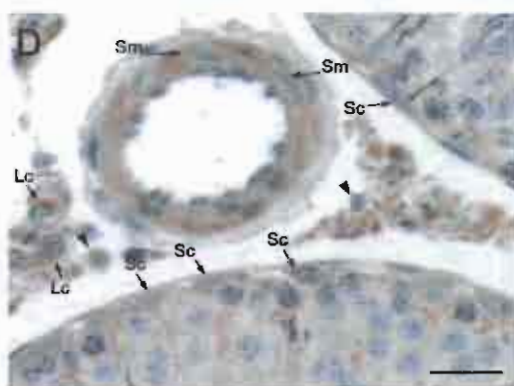
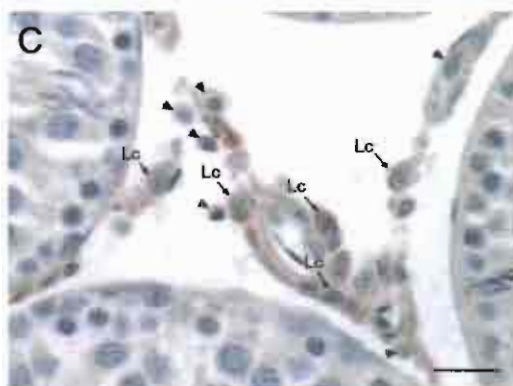
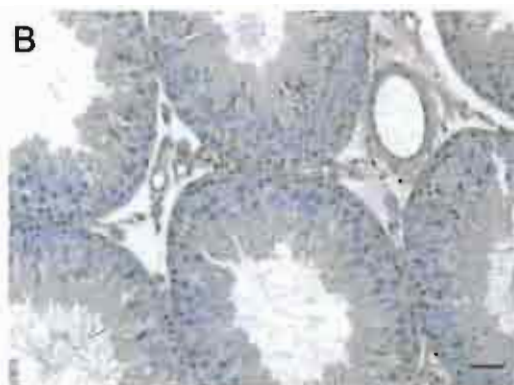
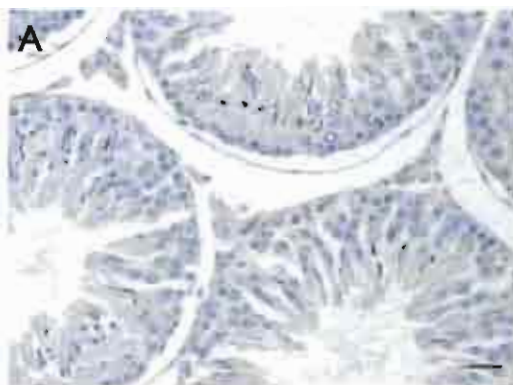


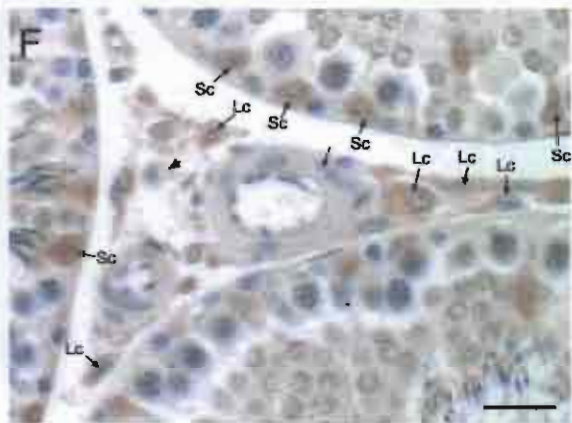
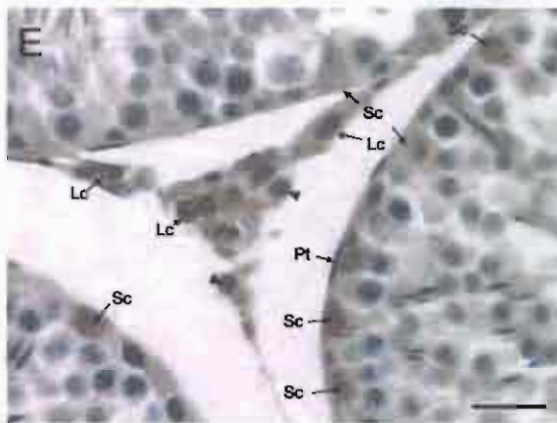
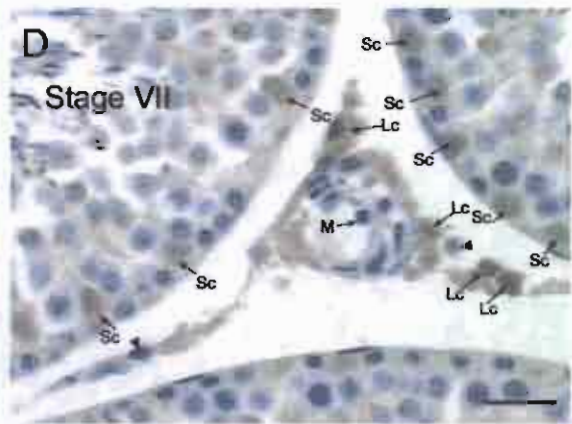
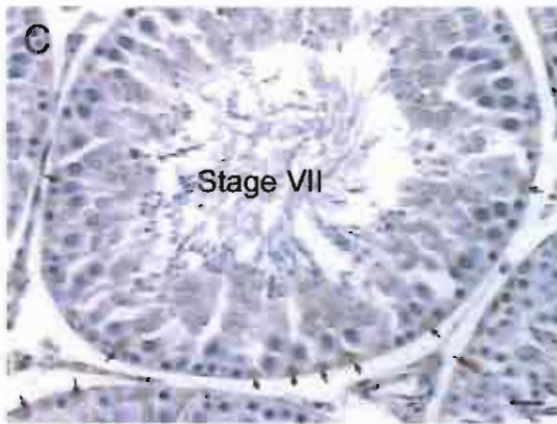
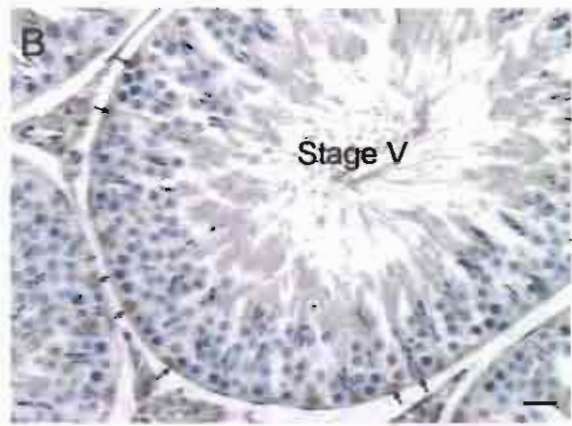
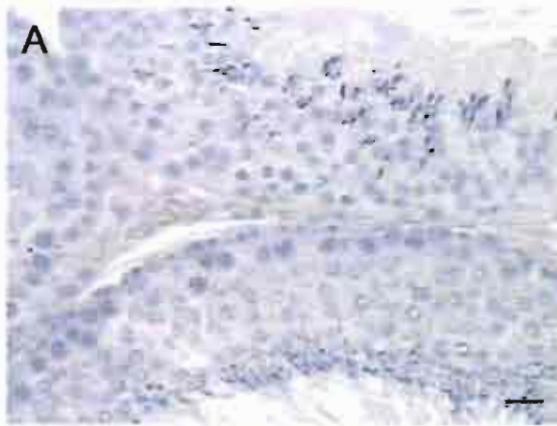


รูปที่ 2 แสดง immunohistochemical staining ด้วย CD14 antibody บนเนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท (A)เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท 6 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับ LPS เมื่อย้อมโดยที่ไม่มี primary antibody ใช้เป็น negative control (B-D)เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรทที่ได้รับ normal saline (control group) (E-F) เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท 3 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับ LPS (G-H) เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท 6 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับ LPS

ห้วลูกศร = monocyte like macrophage, Lc = Leydig cells, Sc = Sertoli cells, M = neutrophils, Sg = Spermatogonium, P = Pachytene spermatocytes, S = Spermatids, Pt = Peritubular cells, Bar = 20 μ m



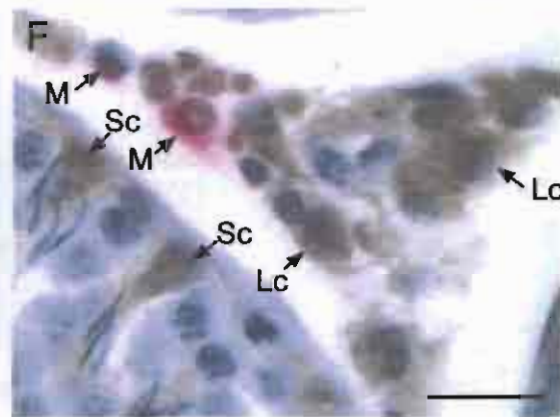
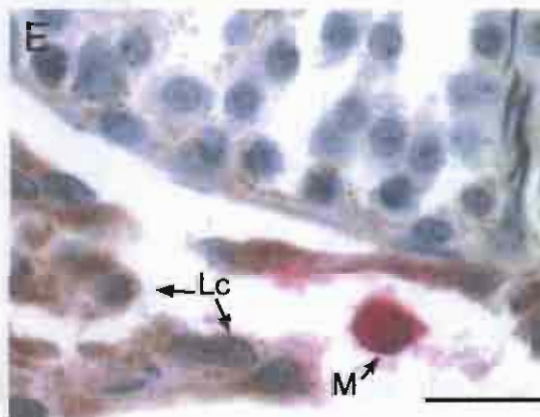
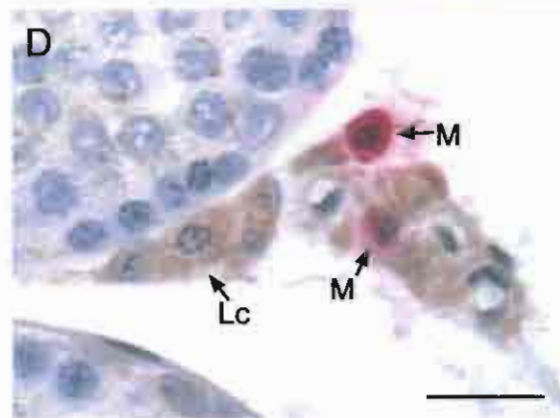
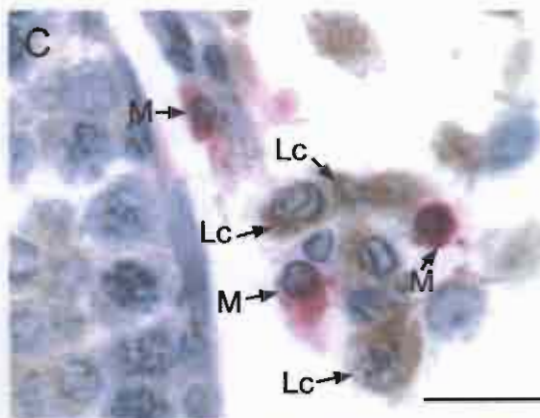
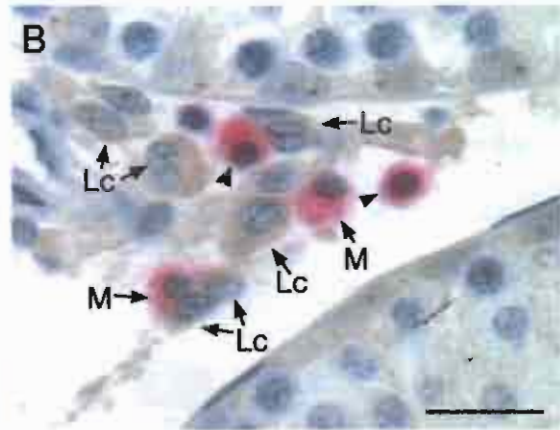
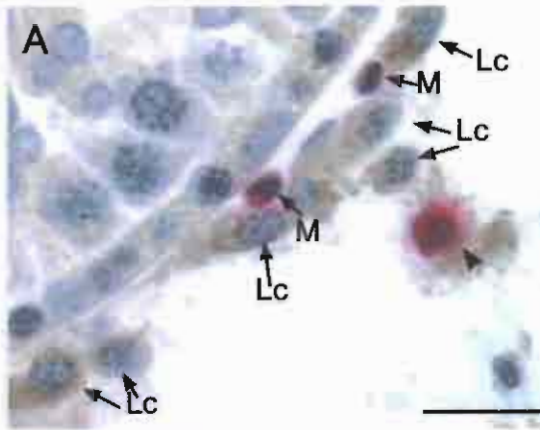
รูปที่ 3 แสดง immunohistochemical staining ด้วย TLR4 antibody บนเนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท (A)เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท 6 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับ LPS เมื่อย้อมโดยที่ไม่มี primary antibody ใช้เป็น negative control (B-C) เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรทที่ได้รับ normal saline (control group) หัวลูกศรชี้ Sertoli cells (E-F) เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท 3 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับ LPS หัวลูกศร = monocyte like macrophage, Lc = Leydig cells, Sc = Sertoli cells, M = monocytes Bar = 20 μ m,

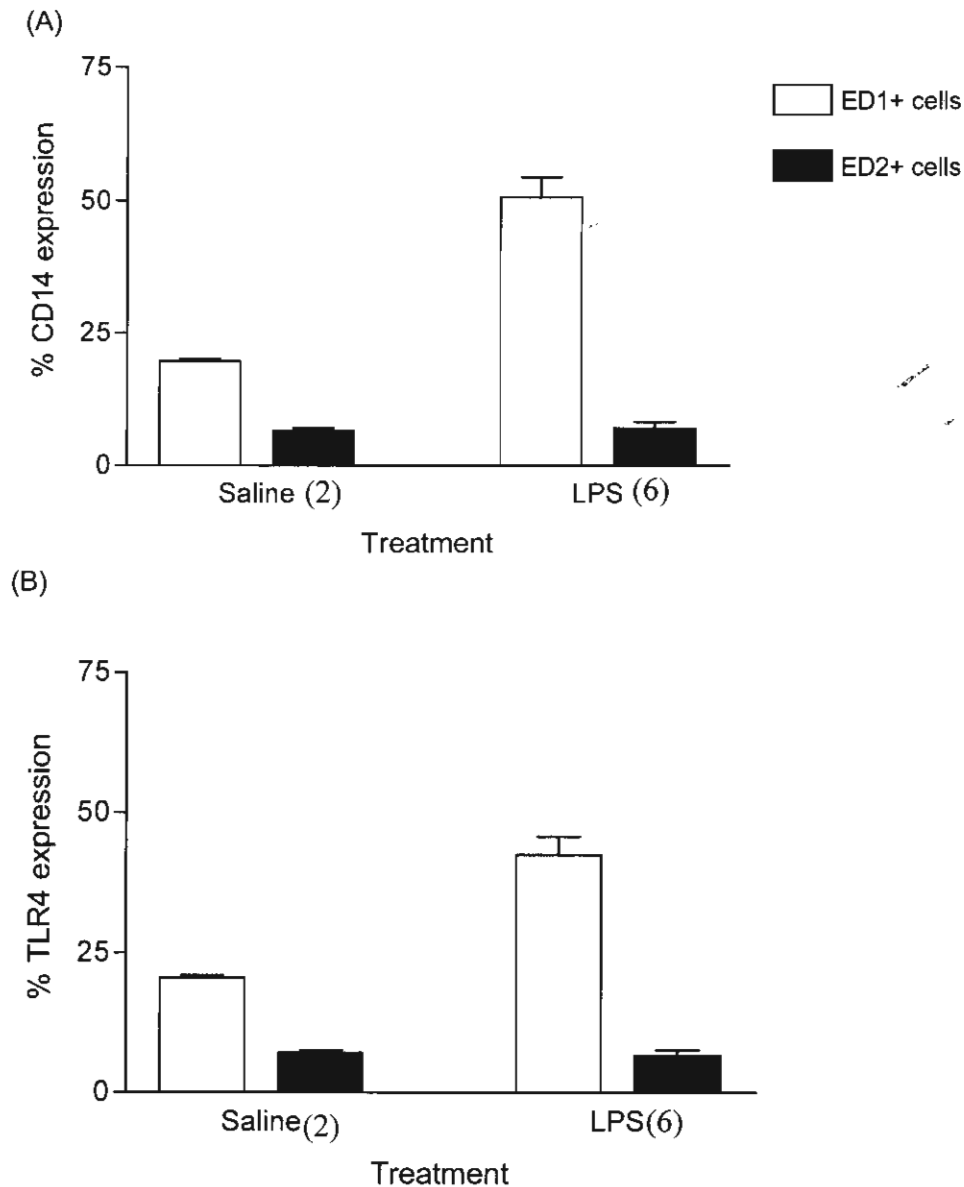


รูปที่ 4 แสดง double immunohistochemical staining ระหว่าง ED1 และ ED2 antibodies กับ CD14 หรือ TLR4 บนเนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท (A-D) เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรทที่ได้รับ normal saline (control group) (A) เมื่อย้อมด้วย ED1 ร่วมกับ CD14 antibodies (B) เมื่อย้อมด้วย ED1 ร่วมกับ TLR4 antibodies (C) เมื่อย้อมด้วย ED2 ร่วมกับ CD14 antibodies (D) เมื่อย้อมด้วย ED2 ร่วมกับ TLR4 antibodies (E-F) เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูแรท 12 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับ LPS (E) เมื่อย้อมด้วย ED2 และ CD14 antibodies (F) เมื่อย้อมด้วย ED2 และ TLR4 antibody

หัวลูกศร = double-stained macrophages, M = resident macrophages, Lc = Leydig cells,
Sc = Sertoli cells

Bar = 20 μ m,





รูปที่ 5 แสดงจำนวนร้อยละของ ED1⁺ และ ED2⁺ macrophages ภายใน testicular interstitium ที่มีการแสดงออกของ (A) CD14 และ (B) TLR4 โดย open bars คือ จำนวนร้อยละของ ED1⁺ macrophages ที่มีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 ในอวัยวะของหนูแรทที่ได้รับ normal saline (control group) และจากอวัยวะของหนูแรท 3-6 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับ LPS ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับ LPS ดังนั้นจึงได้นำข้อมูลมาอยู่เป็นกลุ่มเดียวกัน จำนวนหนูแรทที่ใช้อยู่ในวงเล็บ

TLR-4 protein ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ endothelial cells, smooth muscle cells ที่อยู่ล้อมรอบหลอดเลือด และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในหลอดเลือดไม่พบว่าการแสดงออกของ TLR-4 protein (M; รูปที่ 3D)

ในอวัยวะของหนูแรทหลังจากได้รับ LPS 3 ชั่วโมงเป็นต้นไป พบว่าการแสดงออกของ CD14 และ TLR-4 protein เพิ่มขึ้นใน testicular interstitium โดยเฉพาะ Leydig cells (Lc; รูปที่ 2E, F, H รูปที่ 3E, F) รวมทั้ง Neutrophils ในหลอดเลือด (M; รูปที่ 2F) ส่วนเซลล์ที่มีรูปร่างคล้าย monocytes และ macrophages ใน testicular interstitium มีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 protein ในระดับต่ำหรือไม่ชัดเจนในทุกกลุ่มหลังจากได้รับ LPS (หัวลูกศร; รูปที่ 2E, F, H รูปที่ 3E, F) ใน seminiferous tubules การแสดงออกของ CD14 protein จะแตกต่างกับ TLR-4 protein โดยใน seminiferous tubule ของหนูแรทหลังจากได้รับ LPS 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป spermatogonium (Sg; รูปที่ 2F), spermatocytes (P,S; รูปที่ 2G, H) เริ่มมีการแสดงออกของ CD14 protein มากขึ้น แต่จะไม่มีการแสดงออกของ TLR-4 protein โดยเซลล์ดังกล่าวหลังจากที่ได้รับ LPS ในเวลาเดียวกัน (รูปที่ 3E, F) ส่วนการแสดงออกของ CD14 protein และ TLR-4 protein โดย Sertoli cells จะพบในทุกๆ seminiferous tubules หลังจากที่ได้รับ LPS ตั้งแต่ 3 ชั่วโมงเป็นต้นไป (Sc; รูปที่ 2E, G, H , รูปที่ 3E, F) นอกจากนี้ peritubular cells มีการแสดงออกเฉพาะ CD14 protein ใน 6 ชั่วโมงหลังจากหนูได้รับ LPS (Pt, รูปที่ 2H)

3. Expression of CD14 and/or TLR4 in testicular Macrophages

เพื่อต้องการที่จะแยกประชากรของ testicular macrophages ที่มี CD14 และ TLR-4 protein จากการทำให้ double-labeling โดยใช้ ED1 และ ED2 กับ CD14 หรือ TLR-4 antibodies ในอวัยวะของหนูกลุ่ม control พบว่า ED1⁺ macrophages มีการแสดงออกของ CD14 protein (หัวลูกศร, รูปที่ 4A) และ TLR4 protein (หัวลูกศร, รูปที่ 4B) แต่ ED2⁺ macrophages ไม่พบว่าการแสดงออกร่วมกันของ CD14 และ TLR4 (M, รูปที่ 4C, D)

ในอวัยวะของหนูกลุ่มที่ได้รับ LPS พบว่า ED1⁺ macrophages มีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 protein (ไม่ได้แสดงภาพ) แต่ ED2⁺ macrophages ไม่พบว่าการแสดงออกของทั้ง CD14 และ TLR4 (M, รูปที่ 4E, F)

เมื่อทำการนับจำนวน testicular macrophages ที่ติดสี double-stained กับ CD14 และ TLR4 ในอวัยวะของหนูแรทจาก control groups และจากกลุ่มที่ได้รับ LPS พบว่าประมาณ 4-7% ของ ED2⁺ macrophages มีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 protein ในขณะที่ประมาณ 19-20% ของ ED1⁺ macrophages มีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 protein (รูปที่ 5) หลังจากที่ได้รับ LPS สัดส่วนของ ED2⁺ macrophages ที่มี CD14 และ TLR4 protein ที่เวลา 3-6 ชั่วโมงหลังจากหนูแรทได้รับ LPS ไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวน ED1⁺ macrophages ที่มีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 protein ประมาณ 2 เท่า (30-50%) (รูปที่ 5)

วิจารณ์

Lipopolysaccharide (LPS) ประกอบเป็นส่วนหนึ่งของ integral part ของผนังแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อร่างกายได้รับ LPS มีผลทำให้เกิดสภาวะต่างๆ เช่น ช็อก, ไข้สูง และมีการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว (leucopenia) จากการศึกษาพบว่า การที่ LPS กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของร่างกาย เกิดขึ้นจากการจับกันของ LPS กับ cellular receptors มีการพบว่า cellular receptors ที่มีส่วนร่วมในการจับกับ LPS มีหลายชนิด (Lee, et al. 1992; Tobias, et al. 1993; Ingalls 1995; Schletter, et al. 1995; El-Samalouti, et al. 1997; Lien, et al. 2000; Schroder, et al. 2000) แต่ CD14 มีความเป็นไปได้ที่จะทำหน้าที่หลักในการเป็น binding element ของ LPS receptor complex ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การแสดงออกของ CD14 พบได้ใน myeloid-derived cells เช่น monocytes และ macrophages (Lee, et al. 1992; Tobias, et al. 1993; Ingalls 1995; Schletter, et al. 1995; El-Samalouti, et al. 1997; Lien, et al. 2000; Schroder, et al. 2000) จากการศึกษาพบว่า non-leukocytes จะตอบสนองต่อ LPS หลังจากที่ LPS รวมกับ LPS-binding protein (LBP) และ soluble CD14 (Goldblum, et al. 1994; Haiman, et al. 1994; Schumann, et al. 1994; Tobias 1994; Tobias, et al. 1995) เกิดเป็น LPS-LBP-CD14 complex จะร่วมกันไปยัง toll-like receptor 4 (TLR-4) (Beutler, 2000) และ molecules อื่นที่อยู่บนผิวเซลล์ (Shimazu, et al. 1999) ทำให้เซลล์ตอบสนองต่อ LPS และก่อให้เกิดการกระตุ้น downstream cellular signaling pathways และการสร้าง cytokines ตามมา (Wright, et al. 1990; 1991; Pugin, et al. 1997; Chow, et al. 1999) ถึงแม้จะมีรายงานว่า LPS สามารถจับกับ TLR4 ได้แต่ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ตอบสนองได้ดีเหมือนกับการจับกับ CD14-TLR-4 complex (Means, et al. 1999; Lien, et al. 2000; Beutler 2000b) TLR4 มีส่วนสำคัญในปฏิกิริยา CD14-dependent LPS responses (Jiang, et al. 2000; Schroder, et al. 2000; de Silva Correia, et al. 2001) และเป็น signaling molecules ที่สำคัญที่พบบนผิวของเซลล์ที่จะตอบสนองต่อ LPS (Hoshino, et al. 1999; Akashi, et al. 2000; Jiang, et al. 2000)

จากการศึกษาค้นคว้าพบว่ามี CD14 และ TLR4 protein ในอวัยวะปกติ เป็นการบ่งบอกได้ว่า CD14 และ TLR4 มีการสร้างอยู่ตลอดเวลาในเซลล์ของอวัยวะที่เป็น non-myeloid cells เช่น Leydig cells และ Sertoli cells การแสดงออกดังกล่าวไม่ได้เกิดจาก intratesticular inflammation ยืนยันได้จากการที่พบ endothelial cells และ เซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดเลือดไม่มีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 protein จึงเป็นการสนับสนุนการศึกษาที่พบ soluble CD14 ใน seminal plasma, และ spermatozoa (Harris, et al. 2001) และพบ TLR4 mRNA ในอวัยวะคนปกติ (Nishimura 2005) และพบ Leydig cells (Jing, et al. 2003) ในอวัยวะหนูแรทปกติ เป็นการยืนยันความสามารถของเซลล์ในอวัยวะที่จะตอบสนองต่อ inflammatory stimuli ได้

การพบที่มีการสร้าง CD14 และ TLR4 proteins โดย Sertoli cells ที่พบเฉพาะบางช่วงของการเจริญของท่อ seminiferous tubules ในอวัยวะปกติ อาจเป็นการชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นที่

จะต้องมี LPS receptors ในขบวนการ spermatogenesis เนื่องจาก Sertoli cells ทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่เลี้ยงและเป็น blood-testis barrier เพื่อป้องกัน germ cells ที่กำลังพัฒนาอยู่ใน seminiferous tubules จาก antigens ที่ผ่านเข้ามา จึงเป็นการสนับสนุนการศึกษาที่ว่า non-immune cells ในอวัยวะสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS (Gerdprasert, et al. 2002)

เมื่อมีการฉีด LPS ทางช่องท้องพบว่ามีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 protein ที่มากขึ้นภายหลังจากที่หนูได้รับ LPS ไปแล้ว 3 ชั่วโมง โดยเซลล์ที่พบว่ามี CD14 และ TLR 4 protein มากขึ้นคือ Leydig cells, Sertoli cells และเมื่อหนูได้รับ LPS ไปแล้ว 6 ชั่วโมงพบว่า spermatocytes, spermatogonium, peritubular cells เริ่มมีการแสดงออกเฉพาะ CD14 protein แต่ไม่พบว่าการแสดงออกของ TLR4 protein โดยเซลล์ดังกล่าว เป็นการยืนยันบทบาทของ Leydig cells และ Sertoli cells ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS ก่อนซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป spermatogonium และ spermatocytes รวมไปถึง peritubular cells จึงเริ่มมีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 ตามมาซึ่งอาจเป็นทางหนึ่งที่ว่าร่างกายต้องการชะลอการตอบสนองต่อ LPS โดย sperm cells เพื่อลดความรุนแรงที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งแนวทางนี้ยังต้องมีการศึกษาต่อไปอีก

เมื่อมีการใช้ double-labeling ด้วย CD14 กับ ED1 และ ED2 หรือ TLR4 กับ ED1 และ ED2 เพื่อแยกกลุ่มต่างๆของ testicular macrophages พบว่า CD14 และ TLR4 สามารถพบได้ใน monocytes หรือ macrophages ที่เป็น ED1⁺ cells แต่พบได้น้อยจนไม่พบเลยใน ED2⁺ resident macrophages ในทุกกลุ่มการทดลอง ข้อมูลนี้เป็นการช่วยสนับสนุนสำหรับทฤษฎีที่กล่าวว่า resident testicular macrophages ไม่มีความสามารถในการสร้าง inflammatory cytokines และ inflammatory mediators อื่นเช่น nitric oxide (Kern, et al. 1995; Hayes, et al. 1996; Gerdprasert, et al. 2002a,b) ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่า macrophages ซึ่งโดยปรกติเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS ลดบทบาทลงเมื่อเข้ามาอยู่สภาพแวดล้อมในอวัยวะโดยลดหรือไม่มีการสร้าง CD14 และ TLR4 protein เมื่อเซลล์เข้ามาอยู่ในอวัยวะและเปลี่ยนตัวเองเป็น resident testicular macrophages แต่กลไกดังกล่าวไม่มีผลต่อ testicular cells อื่นๆเช่น Leydig cells และ Sertoli cells จึงยังคงความสามารถในการตอบสนองต่อ LPS ได้ กลไกดังกล่าวยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

โดยสรุปการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดถึงความสามารถ non-immune cells ในอวัยวะที่จะตอบสนองต่อ inflammatory stimuli นำไปสู่การตอบคำถามที่ว่าเหตุใด resident testicular macrophages จึงลดความสามารถในการสร้าง inflammatory cytokines เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย inflammatory stimuli เมื่อเทียบกับ macrophages จากอวัยวะอื่น ระยะเวลาที่เริ่มมีการแสดงออกของ CD14 และ TLR4 โดยเซลล์ในอวัยวะที่แตกต่างกันอาจเกี่ยวข้องกับเหตุการณ์ที่ graft tissues สามารถอยู่ในอวัยวะได้นานและการเกิดปรากฏการณ์ immune privilege ในอวัยวะซึ่งยังต้องมีการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Adamopoulos, D. A., D. M. Lawrence, et al. (1978). "Pituitary-testicular interrelationships in mumps orchitis and other viral infections." Br Med J 1(6121): 1177-1180.
2. Akashi, S., H. Ogata, et al. (2000). "Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2." Biochem Biophys Res Commun 268: 172-177.
3. Antal-Szalmas, P. (2000). "Evaluation of CD14 in host defence." Eur J Clin Invest 30: 167.
4. Beutler, B. (2000). "Endotoxin, toll-like receptor 4 and the afferent limb of innate immune response." Nature 406: 782-787.
5. Beutler, B. (2000b). "Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor." Curr Opin Immunol 12: 20-26.
6. Chow, J. C., D. W. Young, et al. (1999). "Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." J Biol Chem 274: 10689-10692.
7. Cudicini, C., H. Lejeune, et al. (1997). "Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6." J Clin Endocrinol Metab 82: 1426-1433.
8. Cutolo, M., E. Balleari, et al. (1988). "Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotrophin stimulation." Arthritis Rheum 31(10): 1314-1317.
9. de Silva Correia, J., K. Soldau, et al. (2001). "Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD2." J Biol Chem 276: 21129-21135.
10. De, S. K., H. L. Chen, et al. (1993). "Expression of tumor necrosis factor alpha in mouse spermatogenic cells." Endocrinology 133: 389-396.
11. El-Samallouti, V. T., J. Schletter, et al. (1997). "Detection of lipopolysaccharide (LPS)-binding membrane proteins by immuno-coprecipitation with LPS and anti-LPS antibodies." Eur J Biochem 250: 418-424.
12. Ganfloff, S. C., N. Hijiya, et al. (1999). "Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14 dependent pathways." Clin Infect Dis 28: 491.
13. Gerard, N., V. Syed, et al. (1992). "Lipopolysaccharide, latex beads and residual bodies are potent activators of testis cell interleukin-1 alpha production." Biochem Biophys Res Commun 185: 154-161.
14. Gerdprasert, O., M. K. O'Bryan, et al. (2002a). "The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population." Cell Tissue Res 308(2): 277-85.
15. Gerdprasert, O., M. K. O'Bryan, et al. (2002b). "Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis." Mol Hum Reprod 8(6): 518-24.
16. Goldblum, S. E., T. W. Brann, et al. (1994). "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein and soluble CD14 function as accessory molecules for LPS-induced changes in endothelial barrier function in vivo." J Clin Invest 93: 692-702.
17. Haiman, E., H. S. Lichenstein, et al. (1994). "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14." J Exp Med 179: 269-277.
18. Harris, C. L., M. A. Vigar, et al. (2001). "The lipopolysaccharide co-receptor CD14 is present and functional in seminal plasma and expressed on spermatozoa." Immunology 104: 317-323.
19. Hayes, R., S. A. Chalmers, et al. (1996). "Secretion of bioactive interleukin-1 by rat testicular macrophages in vitro." J Androl 17: 41-49.
20. Head, J. R., W. B. Neaves, et al. (1983a). "Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival." Transplantation 36(4): 423-431.

21. Head, J. R., W. B. Neaves, et al. (1983b). "Reconsideration of the lymphatic drainage of the rat testis." Transplantation **35**(1): 91-95.
22. Hedger, M. P. (1997). "Testicular leukocytes: what are they doing?" Rev Reprod **2**(1): 38-47.
23. Hoshino, K., O. Takeuchi, et al. (1999). "Cutting edge: toll-like receptor 5 (TLR4) deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the lps gene product." J Immunol **162**: 3749-3752.
24. Ikejima, K., N. Enomoto, et al. (1992). "Pronose destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on kupffer cells." Am J Physiol **276**: G591-598.
25. Ingalls, R. R. and D. T. Golenbock (1995). "CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide." J Exp Med **181**: 1473-1479.
26. Jiang, Q., S. Akashi, et al. (2000). "Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kB." J Immunol **165**: 3541-3544.
27. Jing, H. U., Z. Yuan-Qiang, et al. (2003). "Expression and localization of Smad1, Smad2 and Smad4 proteins in rat testis during postnatal development." Asian J Andro **5**: 51-55.
28. Kern, S., S. A. Robertson, et al. (1995). "Cytokine secretion by macrophages in the rat testis." Biol Reprod **53**: 1407-1416.
29. Lee, J. D., K. Kato, et al. (1992). "Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." J Exp Med **175**: 1697-1705.
30. Lien, E., T. K. Means, et al. (2000). "Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide." J Clin Invest **105**: 497-504.
31. Lin, T., D. Wang, et al. (1993). "Human chorionic gonadotropin induces interleukin-1 gene expression in rat Leydig cells in vivo." Mol Cell Endocrinol **95**: 139-145.
32. Mallaney, B. P. and M. K. Skinner (1993). "Transforming growth factor beta (1,2,3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis." Mol Endocrinol **7**: 67-76.
33. Means, T. K., E. Lien, et al. (1999). "The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for toll-like receptors." J Immunol **163**: 6748-6755.
34. Meinhardt, A., M. Bacher, et al. (1996). "Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for
a role in the regulation of testicular function." Endocrinology **137**: 5090-5095.
36. Meinhardt, A., M. Bacher, et al. (1998). "Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the role of the seminiferous tubules, testosterone, macrophage-migration inhibitory factor." Biol Reprod **59**: 571-578.
37. Niemi, M., R. M. Sharpe, et al. (1986). "Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis." Cell Tissue Res **243**(2): 337-344.
38. Nishimura, M. and S. Naito (2005). "Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes." Biol Pharm Bull **28**: 886-892.
39. O'Bryan, M. K., O. Gerdpraser, et al. (2005). "Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal
localized suppression of inflammatory responses." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**: R1744-1755.
41. O'Bryan, M. K., S. Schlatt, et al. (2000). "Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo." Endocrinology **141**(1): 238-246.
42. Okuda, Y., C. W. Bardin, et al. (1995). "Interleukin -1 alpha and 1 beta regulate interleukin-6 expression in Leydig and Sertoli cells." Recent Prog Horm Res **50**: 367-372.
43. Pollanen, P. and S. Maddocks (1988). "Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis." J Reprod Fertil **82**(2): 437-445.

44. Pugin, J., V. V. Kravchenko, et al. (1997). "Cell activation mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored or transmembrane forms of CD14." *Infect Immun* **66**: 1174-1180.
45. Schletter, J., H. Brade, et al. (1995). "Binding of lipopolysaccharide (LPS) to an 80-kilodalton membrane protein of human cells is mediated by soluble CD14 and LPS-binding protein." *Inf Immun* **63**: 2576-2580.
46. Schroder, N. W., B. Opitz, et al. (2000). "Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14 and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by Treponema glycolipids." *J Immunol* **165**: 2683-2693.
47. Schumann, R. R., E. T. Ietschel, et al. (1994). "The role of CD14 and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin." *Med Microbiol Immunol* **183**: 279-297.
48. Shimazu, R., S. Akashi, et al. (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." *J Exp Med* **189**: 1777-1782.
49. Tobias, P. S., K. Soldau, et al. (1995). "Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14." *J Biol Chem* **270**: 10482-10488.
50. Tobias, P. S., K. Soldau, et al. (1993). "Cross-linking of lipopolysaccharide (LPS) to CD14 on THP-1 cells mediated by LPS-binding protein." *J Immunol* **150**: 3011-3021.
51. Tobias, P. S. and R. J. Ulevitch (1994). "Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in the lipopolysaccharide-dependent activation of cells." *Chest* **105**: 485-505.
52. Triantafilou, K., M. Triantafilou, et al. (2001). "A CD14-independent LPS receptor cluster." *Nat Immunol* **2**: 338.
53. Wang, D. L., M. L. Nagpal, et al. (1991). "Interleukin-1 beta induces interleukin -1 alpha messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of Leydig cells." *Endocrinology* **129**: 2862-2866.
54. Wang, J., N. G. Wreford, et al. (1994). "Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants." *Biol Repro* **51**(3): 551-561.
55. Wreford, N. G. (1995). "Theory and practice of sterological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume in the testis." *Microsc Res Tech* **32**: 423-436.
56. Wright, S. D., R. A. Ramos, et al. (1991). "Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: evidence on lipopolysaccharide binding protein and CD14." *J Exp Med* **173**: 1281-1286.
57. Wright, S. D., R. A. Ramos, et al. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." *Science* **249**: 1431-1433.