รายงานประจำปีที่ 3

(1 ธันวาคม 2539 - 30 พฤศจิกายน 2540)

ความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิวิทยาในโรคมาลาเรีย กับการหลั่งสาร CYTOKINES

วันที่.....
เลขทะเบียน.....
เลขเรียก.....

รศ. ดร. รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร

ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 298-0455 โทรสาร 298-0476
URL : http://www.trf.or.th
E-mail : trf-info@trf.or.th

ห้องสมุด
สกว
TRF

บทคัดย่อ

การศึกษาสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆ โดยการตรวจหาสาร cytokines ที่อยู่ในเนื้อเยื่อสมองของผู้เสียชีวิตด้วยมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมนั้นพบว่า ในผู้เสียชีวิตด้วย cerebral malaria (CM) มักจะมีเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียเกาะอยู่กับผนังเส้นเลือดจำนวนมาก และทำให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดฝอยทั้งหมด และแตกต่างกับรายผู้เสียชีวิตด้วย noncerebral malaria (NCM) ซึ่งไม่มีเม็ดเลือดแดงติดเชื้อเกาะอยู่ในเส้นเลือดเลย ผลจากการอุดตันนี้ทำให้ตรวจพบ edema และ ring haemorrhage ในเนื้อเยื่อสมองของกลุ่มที่เสียชีวิตด้วย CM ผลจากการตรวจหา cytokines ในเนื้อเยื่อสมองเหล่านี้โดยวิธี immunofluorescence assay พบว่า ในกลุ่ม CM มี TNF-α, IFN-γ, IL-1β และ IL-10 อยู่ในระดับสูง แต่มี IL-4 ต่ำมากหรือไม่มี ผลการตรวจนี้แตกต่างจากที่พบในเนื้อสมองของกลุ่ม NCM คือมี IL-4 สูง แต่จะไม่มี TNF-α, IFN-γ, IL-1β หรือ IL-10 หรือมีแต่อยู่ในระดับต่ำ การศึกษานี้แสดงว่า cytokines ที่พบในเนื้อเยื่อสมองอาจเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อแต่ไม่แสดงความสัมพันธ์กับการเสียชีวิตของผู้ป่วย

การศึกษาหา mRNA ของ cytokines เพื่อยืนยันความแตกต่างของชนิดและระดับของ cytokines ในเนื้อเยื่อสมองเหล่านี้ยังไม่ได้ผลสรุปที่ดี พบว่าการสกัด mRNA จากเนื้อเยื่อสมองที่แช่แข็งไว้นั้นได้ปริมาณ mRNA น้อยมากและการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ก็ไม่สามารถแสดง mRNA ของ cytokines ใดๆ ได้ จึงจำเป็นต้องหาทางตรวจสอบด้วยวิธีใหม่ เช่น in situ PCR-hybridization โดยตรงบนเนื้อเยื่อสมอง เป็นต้น

ABSTRACT

Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* infection was investigated by determination of cytokines in the brain tissues of fatal malaria. Histopathology examination of the brain tissues showed infected red cell (PRBC) occlusion in 100% of microvessels of cerebral malaria (CM). This was different from the noncerebral malaria (NCM) that there was no PRBC occlusion in the vessels. Edema and ring haemorrhage were found only in the CM case. Using the indirect immunofluorescence assay, moderate to high levels of TNF-α, IFN-γ, IL-1β, and IL-10 were found in the brain of CM case but IL-4 was low or absent. On contrary, the IL-4 level was high in the brain of NCM case but TNF-α, IFN-γ, IL-1β, and IL-10 were either low or absent. These results suggest that cytokines in the brain tissues involve in the histopathogenesis but, unlike the plasma cytokine level, it is not associated with mortality of malaria.

Determination of mRNA of these cytokines from frozen brain tissues by polymerase chain reaction was uninterpretable which might be due to the loss of mRNA during extraction or storage of the tissues. A new technique of in situ PCR-hybridization will be tested with the new frozen tissues in the future.

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบชนิดและระดับของ cytokines ในเนื้อเยื่อสมองของผู้เสียชีวิตด้วย cerebral malaria กับ noncerebral malaria

2. เพื่อตรวจหา cytokines ซึ่งอยู่ในรูปของ mRNA ในเนื้อเยื่อสมองของผู้เสียชีวิตด้วย cerebral malaria

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในการวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิวิทยาในโรคมาลาเรียกับการหลั่งสาร cytokines ต้องการศึกษาถึงสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดพยาธิสภาพในอวัยวะที่สำคัญชนิดต่างๆ ของผู้ติดเชื้อมาลาเรียแบบรุนแรง หรือมาลาเรียขึ้นสมอง cerebral malaria ในระหว่างที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ การขยายจำนวนเชื้อ และการดำเนินของโรคที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จะทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิต้านทานของร่างกาย ทั้งนี้จะมีการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิด เช่น พวกโมโนซัยท์ แมคโครเฟจ และ พวกลิมโฟซัยท์ ให้มีการตอบสนองต่อโรคที่กำลังดำเนินอยู่ ขบวนการตอบสนองแบบหนึ่งที่ตรวจพบได้ในห้องปฏิบัติการวิจัยทางมาลาเรีย คือ การหลั่งสารโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า cytokines ซึ่งประกอบด้วย ชนิด การทำงาน และต้นกำเนิดที่ต่างๆ กัน การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการตรวจพบสาร cytokines บางชนิดในเลือดของผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียนั้น มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับความรุนแรงของโรคมาลาเรีย และจากผลการศึกษาที่ผ่านมาของโครงการนี้ ทำให้ทราบว่ามี cytokines บางชนิดอยู่ในเนื้อเยื่อที่สำคัญ เช่น เนื้อเยื่อสมองของผู้เสียชีวิตด้วย cerebral malaria

ผลงานวิจัย (ดู manuscript ที่แนบมา)

จากการตรวจพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสมองของผู้เสียชีวิต 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม cerebral malaria และ กลุ่ม noncerebral malaria ด้วย hematoxylin & eosin staining นั้นพบว่าเนื้อเยื่อสมองจากราย cerebral malaria จะมีเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ sequester อยู่ในเส้นเลือดฝอยจำนวนมาก และคิดเป็น 100% ของจำนวนเส้นเลือดที่ตรวจ เมื่อเทียบกับในราย noncerebral malaria ซึ่งพบว่าไม่มีเม็ดเลือดแดงติดเชื้ออยู่ในเส้นเลือดฝอย ลักษณะของ edema และ ring haemorrhage ในราย cerebral malaria มีมากกว่าในราย noncerebral malaria ส่วน infiltration ของ leukocytes ในเนื้อเยื่อสมองของทั้ง 2 กลุ่มนั้นมีเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย การตรวจหา cytokines ในเนื้อเยื่อสมองเพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม cerebral

malaria และกลุ่ม noncerebral malaria โดยวิธีการย้อมเนื้อเยื่อด้วย antibodies พบว่า กลุ่ม cerebral malaria มีปริมาณ TNF-α, IFN-γ, IL-1β, และ IL-10 อยู่ในระดับสูง แต่จะมีปริมาณ IL-4 อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งผลที่ได้นี้จะแตกต่างกับปริมาณที่ตรวจพบในกลุ่ม noncerebral malaria คือจะมี cytokines ทั้งหมดอยู่ในระดับต่ำยกเว้น IL-4 ซึ่งจะมีอยู่ในปริมาณสูงกว่า cytokines อื่นๆ แสดงว่า cytokines ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อสมองอาจเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อ แต่ cytokines เหล่านี้ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์กับการเสียชีวิตของผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งอาจจะแตกต่างกับที่พบ cytokines กลุ่มนี้ในเลือดผู้ป่วย cerebral malaria และแสดงความสัมพันธ์กับการเสียชีวิต ผลงานนี้ได้รวมเขียนเป็นรายงานและกำลังส่งเพื่อตีพิมพ์แล้ว

เพื่อเป็นการยืนยันว่า ความแตกต่างของ cytokines ในระดับโปรตีนที่พบในกลุ่ม cerebral malaria และกลุ่ม noncerebral malaria นั้นเป็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นจริง หรือเป็นเพียงความแตกต่างในระยะเวลาของการผลิต cytokines ที่เกิดขึ้นในผู้ติดเชื้อมาลาเรียแต่ละราย เราจึงทำการศึกษา mRNA ของ cytokines ในเนื้อเยื่อสมองที่เก็บโดยวิธีแช่แข็งจากผู้เสียชีวิตด้วย cerebral malaria และ noncerebral malaria แต่ความพยายามดังกล่าวยังไม่ได้ผลสรุปที่ดี กล่าวคือ จากการพยายามเตรียม mRNA จากเนื้อเยื่อสมองต่างๆนี้ พบว่าเมื่อเทียบกับปริมาณ mRNA ที่เตรียมจากเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย concanavalin A แล้ว จะได้ mRNA จากเนื้อเยื่อสมองในปริมาณที่น้อยมาก และเมื่อพยายามตรวจหา mRNA ของ cytokines ด้วยวิธี polymerase chain reaction และ electrophoresis แล้ว ก็ไม่สามารถตรวจพบ mRNA ของ cytokines ใดๆในเนื้อเยื่อสมองได้ จากผลดังกล่าวนี้อาจสรุปได้ 2 แบบ คือ

1) การสร้างโปรตีนของ cytokines ในสมองนั้นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ไม่มี mRNA ของ cytokines อื่นๆค้างอยู่ในเนื้อเยื่อสมองเลย

2) เกิดการสลายตัวของ mRNA ของ cytokines ที่อยู่ในเนื้อเยื่อสมอง ทำให้การสกัด mRNA นั้นได้ผลไม่ดี ทางผู้ดำเนินโครงการวิจัยนี้จะพยายามใช้วิธีการตรวจหาที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นมาใช้ในการศึกษาต่อไป เช่น การใช้ in situ PCR hybridization บน tissue sections

การตีพิมพ์

ผลงานวิจัยปีที่ 3 ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์หนึ่งเรื่องคือ Cytokines associated with pathology in the brain tissue of fatal malaria ใน American Journal of Pathology.

Cytokines Associated with Pathology in the Brain Tissue of Fatal Malaria

Yaowapa Maneerat[1], Emsri Pongponratn[1], Parnpen Viriyavejakul[1], Benjanee Punpoowong[1], Sornchai Looareesuwan[2], Rachanee Udomsangpetch[3]

[1]Department of Tropical Pathology, Faculty of Tropical Medicine, [2]Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, [3]Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Address of correspondence: Rachanee Udomsangpetch, Ph.D.

Department of Pathobiology

Faculty of Science, Mahidol University

Rama 6 Road, Bangkok 10400

Thailand

Fax No. 662-246 1379

ABSTRACT

Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the brain microvascular endothelial cells is believed to be important cause of circulatory blockage in cerebral malaria. Cytokines released during the acute infection can activate endothelial cells leading to increase binding of infected erythrocytes due to subsequent increase of adhesion proteins. This effect may be direct and more potent with the tissue-localized cytokines in the brain. In this study paraffin-embedded brain tissues of cerebral, and of noncerebral malaria were compared. The difference in histopathologic changes of each case was clearly shown. The results demonstrated that tissue-localized TNF-α, IFN-γ, IL-1β, and IL-10 in the brain were associated with cerebral malaria. IL-4 was the only cytokine presented at high level in the brain tissue of noncerebral malaria. No elevation of the adhesion proteins could be demonstrated in the brain tissues of all malaria cases.

INTRODUCTION

Malaria remains one of the serious public health problems in tropical countries. The important cause of severe malaria in human is *Plasmodium falciparum* infection that can lead to cerebral complication and death (review in 1). Sequestration of the erythrocytes containing mature forms of *P. falciparum* in post capillaries may play pathogenic role (2). Two properties of *P. falciparum*-infected erythrocytes involved in the vascular obstruction are cytoadherence (3) and rosetting (4). Histopathology of the brain and other organs in human cerebral malaria are well known. However, there is no appropriate animal model for demonstrating the mechanism in histopathogenesis of cerebral malaria. Immunologically, *P. falciparum* antigens are shown to stimulate cytokine production in vitro by different cell types including monocytes (5) and endothelial cells (6). Elevation of plasma cytokines, i.e. TNFα, IFN-γ, IL-1 (5), and IL-6 (7) has been shown to associate with severity of falciparum malaria. In vitro studies also show that cytokine-activated endothelial cells increase expression of adhesion proteins such as intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) (8), vascular adhesion molecules 1 (VCAM-1), and E-selectin (9). However, involvement of cytokines and adhesion proteins in histopathogenesis of cerebral malaria is not known. Our recent study has shown cytokine localized in the brain tissue of cerebral malaria (10). We therefore investigated further: i) whether cytokines in the brain tissues would be different in cerebral and noncerebral malaria, and ii) whether tissue-localized cytokines would be associated with the expression level of the adhesion protein on endothelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Brain tissues

Paraffin-embedded brain tissues (cerebrum) from 4 fatal *P. falciparum*-infection were obtained from specimen collection between 1985-1990 at the Department of Tropical Pathology, Faculty of Tropical Medicine, Bangkok, Thailand. The specimens were defined as cerebral (n=2) and non-cerebral (n=2) malaria according to the clinical measurements and coma scale (11). Detail clinical data on admission of each case are shown in Table 1.

Histopathology

The paraffin-embedded brain tissues were sectioned at 7 μm thick, and routinely processed for staining with standard Mayer's hematoxylin & eosin. The stained brain tissues were carefully examined with light microscope. Histopathology of the brain tissues of cerebral and non-cerebral malaria cases was then compared.

In addition, parasitized red blood cell (PRBC) sequestration was quantified by examination 100 cerebral microvessels in each case and expressed the number of cerebral microvessels with sequestered PRBC as percentages of sequestration.

Monoclonal Antibodies

Primary antibodies: Murine monoclonal antibodies (MAb) to cytokines including TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-10 were obtained from Genzyme Diagnostics, MA, USA. MAb to adhesion proteins including ICAM-1, VCAM-1, E-selectin were from Becton Dickinson, CA, USA. MAb to CD36 was from Sigma, MO, USA.

Secondary antibody: $F(ab')_2$ fraction of goat anti mouse IgG-conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) from Sigma, MO, USA.

Indirect Immunofluorescence Assay

Brain tissue sections were deparaffinized at 50°C for at least 4 hours, rinsed in xylene twice for 5 min each, and gradually rehydrated twice in absolute ethyl alcohol, 90% and 70% ethyl alcohol for 5 min each, then rinsed gently in running tap water for 5 min, and rinsed briefly with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) before used in immunostaining. The brain sections were incubated with an optimal concentration (40 μg/ml) of MAb to each cytokine, adhesion protein and CD36 in a humidified chamber for 30 min at room temperature. The sections were washed 3 times, 5 min each, in 0.1 M PBS, then incubated with FITC-conjugated $F(ab')_2$ goat anti-mouse IgG at 1:100 dilutions for 30 min, washed as above and mounted with fluorescent mounting medium (DAKO Corporation, CA, USA). The brain sections were then examined under a fluorescence microscope. Intensity of the staining was scored as - = no staining, + = weak staining, ++ = moderate staining, and +++ = strong staining.

RESULTS

Histopathology

Histopathologic changes of the brain tissues between cerebral and noncerebral malaria cases were compared in Table 2.

Cerebral malaria: All cerebral capillaries in the brain sections of the two cerebral malaria cases were congested with PRBC (100% sequestration). Cerebral edema, determined by the gross presence of uncal hernia in post-mortem brain and histological widening of the Virchow-Robin space, was observed only in the brain of case No. 2. Ring or perivascular hemorrhages were also observed in white matter of both cerebral malaria cases but more predominant in case No. 2. Few inflammatory cells, monocytes and lymphocytes, were noted in the blood vessels of case No.2.

Noncerebral malaria: Brain sections of the two noncerebral malaria cases showed no PRBC sequestration. No haemorrhage nor cerebral edema was seen. Only congestion of uninfected erythrocytes in the vessels was observed in the brain and meninges of both cases. Most of nerve cells, glia cells and the stroma were almost found normal.

Determination of tissue cytokines

An indirect immunofluorescence assay was used to determine the presence of cytokines and adhesion proteins in the brain tissues of cerebral and noncerebral malaria. The expression levels of these cytokines were compared in Table 3 in order to evaluate an association between the two malaria groups.

Cerebral malaria: Cytokines found in the brain tissues were TNF-α, IFN-γ, IL-1β, and IL-10. The intensity of fluorescence staining were moderate to strong. Distribution of these cytokines was typical as TNF-α was found in the nerve cell and filamentous tissues (Figure 1A) compared to the negative staining (Figure 1B). IL-1β (Figure 1C) and IL-10 (Figure 1D) were found in bundles of filaments like nerve fibers.

IFN-γ was found in the white matter area adjacent to either the blood vessels or the nerve fiber (Figure 1E). Very weak staining of IL-4 was found (not shown).

Noncerebral malaria: In contrast to those found in cerebral malaria, moderate to strong fluorescence staining intensity of IL-4 (Figure 1F) was observed in the area adjacent to blood vessel. A weak staining of TNF-α, IFN-γ, IL-1β, and IL-10 was occasionally seen (not shown).

Determination of adhesion proteins.

Immunofluorescence staining of adhesion proteins (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) on the endothelial wall of medium to large size blood vessel was negative or found at low level. There was no staining at the endothelial lining of the capillaries. The staining intensity of these adhesion proteins between cerebral and noncerebral malaria showed no difference. CD36 was not found in any of the brain tissue studied.

DISCUSSION

Observation in histopathology of the brain tissues of the cerebral malaria compared to that of noncerebral malaria confirmed that percentages of parasite sequestration in the brain microvessels was a striking difference between the two malaria groups. This finding has been shown previously in an electronmicroscopic study by one of our co-authors (2). Although the cerebral malaria case No.1 had higher coma score and percentage of parasitaemia on admission, the histopathologic examinations showed that brain tissues of case No.2 had edema and complete occlusion of the microvessels with PRBC. The occlusion was more sporadic in case No. 1. This suggests that parasite sequestration alone does not account for the cerebral complication in these cases.

By indirect immunofluorescence, we could demonstrate the expression of TNF-α, IFN-γ, IL-1β, and IL-10 in the brain tissues of cerebral malaria. These observations were in line with other studies showing that elevation of plasma TNF is associted with severity and mortaliy of falciparum malaria (5, 7,12). In a hyperparasitaemic patient, high level of IFN-γ is released from activated T cells and potently synergises in activation of monocytes to produce TNF-α (13). Tissue-associated IL-1β in our study was consistent with the role of TNF-α in stimulation of IL-1β production described previously (14). Increased level of IL-10 in sera during acute *P. falciparum* infection (15) may be associated with the localization of IL-10 in the brain tissues of cerebral malaria. In addition, the levels of cytokines-associated in the tissue was stronger in case No.2 whose pathologic change was more severe than case No.1, and the two noncerebral malaria cases. It is, therefore, concievable that the tissue-localized cytokine in the brain is associated with histopathogenesis and induction of cerebral complication.

Our findings showed marked differences in the type of cytokines found in the brain tissue between cerebral and noncerebral malaria. The differences were not only in

the level of cytokines found, but also showed group specific related to histopathogenesis and cerebral complication in falciparum malaria. TNF-α, IFN-γ, IL-1β, and IL-10 were undoubtedly shown in the brain tissues of cerebral malaria, whereas IL-4 was clearly shown in the brain tissues of noncerebral malaria. This finding was consistent to that observed in *P. berghei* ANKA infection of CBA/J mice in which mRNA of TNF-α and IFN-γ, but not IL-4, were elevated (16). A recent study in mouse infected by human babesia, *Babesia microti* (*B. microti*) or WA1 demonstrates pathogenic effects of cytokines (17). The fatal WA1-infected mice increase production of TNF-α and IFN-γ in the brain throughout the infection. The survived *B. microti*-infected mice, on the other hand, increase production of TNF-α, IL-10 and IL-4 early in the infection, and decrease in the levels during late infection (17).

Previous studies indicate the importance of CD36 (18) and adhesion proteins, including ICAM-1 (12), VCAM-1 and E-selectin (10) in cytoadherence of PRBC, implying the role of these molecules as receptors on endothelium of the brain microvessels. In addition, upregulation of ICAM-1 by cytokines, particularly TNFα, is important in cerebral malaria (19). Our results could not demonstrate the elevation of adhesion proteins nor CD36 in the brain tissues of both cerebral and noncerebral malaria. However, increase adhesion protein level on the endothelial wall of the vessels in cerebral malaria has been shown recently (20). Whether this is due to the difference shown between paraffin-embedded and frozen tissue remains to be investigated.

This study added more information to the understanding of the involvement of cytokines and adhesion proteins in histopathogenesis of severe and cerebral malaria. However, much unknown remains to be unraveled.

REFERENCES

1. Mendis, K. N, and Carter, R. Clinical disease and pathogenesis in malaria. *Parasitol. Today*. **11 (PTI),** 2-16, 1995.
2. Pongponratn, E., Riganti, M., Punpoowong, B., and Aikawa, M. Microvascular sequerstration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: A pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **144,**168-175, 1991.
3. Barnwell, J., Asch, A., Nachman, R., Yamaya, M., Aikawa, M., and Ingravillo, P. A human 88 kDal membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **84**, 1054-1061, 1989.
4. Udomsangpetch, R., Wahlin, B., Carlson, J., Berzins, K., Torii, M., Aikawa, M., Perlmann, P., Wahgren, M. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocytes rosettes. *J. Exp. Med.* **169**, 1835-1840, 1989.
5. Kwiatkowski, D., Hill, A. V. S., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, KR, Cerami , A., Brewster, D. R., and Greenwood, B.M. TNF concentration in fatal cerebral, non fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* **336,** 1201-1204, 1990.
6. Xiao, L., Yang, C., Saekhou, A. M., Udhayakumar, V., and Lal, A. A. Cytokine production by endothelial cell after stimulation with *Plasmodium falciparum* blood stage antigen. The 44th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, 1995. Abstract No. 18, pp. 93.
7. Kern, P., Hemmer, C. J., Damme, J. V., Gruss, H. J., and Dietrich, M. Elevated of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as a markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Med.* **87,** 139-143, 1989.

8. Berendt, A. R., Simmons, D., Tansey , J., Newbold, C., Marsh, K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **341**, 57-59, 1989.

9. Ockenhouse, C. F., Tigoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K. E., Thway, T., Win, K., Aikawa, M., and Lobb, R. R. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: Roles for endothelial leukocytes adhesion molecule1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* **176,** 1183-1189, 1992.

10. Udomsangpetch, R., Chivapat, S., Virayavejakul, P., Riganti, M., Wilairatana, P., Pongponratn, E., and Looareesuwan, S. Involvement of cytokines in the histopathology of cerebral malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **57**, 501-506, 1997.

11. Warrell, D. A., White, N. J., Veall, N., Looareesuwan, S., Chanthavanich, P., Phillips, R.E., Karbwang, J., Krishna, S., and Pongpaew, P. Cerebral anerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human cerebral malaria. *Lancet*, **ii**, 534-538, 1988.

12. Clark, I. A. Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasit. Today*. **3,** 300-5, 1987.

13. Junming, L., and Vilcek, J. Biology of disease tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokine with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* **56**, 234-48, 1987.

14. Dinarello, C. A., and Wolff, S. M. The role of interleukin-1 in disease. *New. Eng. J. Med.* **328,** 106-113, 1993.

15. Peyron, F., Burdin, N., Ringwald, P., Vuilles, J. P., Rousset, F., and Banchereau, J. High level of circulating IL-10 in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.* **95**, 300-303, 1994.

16. Kossodo, S., and Grau, G. E. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J. Immunol.* **151,** 4811-4820, 1993.

17. Hemmer, R. M., Ferrick, D. A., and Conrad, P.A. Roles of cytokines in the pathogenesis of human babesia isolates in mice. The 45th Annual Meeting of The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Maryland, 1996. Abstract No. 410, pp. 235.

18. Roberts D. D., Sherwood J. A., Spitalnik S. L., Panton L. J., Howard R. J., Dixit V. M., Frazier W. A., Miller L. H., Ginsburg V. Thombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* **318**, 64-66, 1985.

19. Berendt, A. R., McDowall, A., Craig, A. G., Bates, P. A., Sternberg, M. J. E., Marsh, K., Newbold, C. I., and Hogg, N. The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but isdistinct from the LFA-1-binding site. *Cell.* **68**, 71-81, 1992.

20. Turner, G. D. H., Morrison, H., Jones, M., Davis, T. M. E., Looareesuwan, S., Buley, I. D., Gatter, K. C., Newbold, C. I., Pukritayakamee, S., Nagachinta, B., White, N. J., and Berendt, A. R. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am. J. Pathol.* **145,** 1057-1069, 1994.

ACKNOWLEDGEMENT

We are greatful to the staff at the Hospital for Tropical Diseases, Mahidol University for assistance with the autopsies, to Dr. M. Riganti for discussion on malaria pathology, to Dr. G. Turner for technical advice and discussion, and to Professor N. J. White for reading of the manuscript. Tissue preparations by Mr. K. Bophan and Mr. V. Kachornsakmethakul are mostly appreciated. This work received financial support from the Thailand Research Fund (TRF). Y. M. is a TRF-Postdoctoral Fellow, R. U. is a TRF-Research Scholar.

Figure 1. Immunofluorescence staining of the brain section from fatal malaria. Cerebral malaria case No. 2 (A) TNF-α in neuron (magnification x 200), (B) neuron of noncerebral malaria shows negative staining (magnification x 400), (C) TNF-α in the nerve fiber of case No. 2 (magnification x 400), (D) IL-10 in the nerve fiber of case No. 2, (E) focal staining of IFN-γ in the white matter (magnification x 200), (F) IL-4 in white matter of noncerebral malaria case No. 3 (magnification x 200), n = neuron, → = nerve fiber, bv = blood vessel.

Table 1. Patient history and some clinical data on admission

Group of severity	Age (years)	Coma[1] score	Conciousness	Parasite/µl	Duration of illness (days)	Duration of hospitalization
Cerebral						
No.1	54	2	Unrousable, motor response non-localizing	314,120	6	14 hours
No.2	18	2		29,900	10	4 hours
Noncerebral						
No.3	26	0	Rousable to fully concious	9,140	5	1 day
No.4	17	0		41,550	5	4 days

[1] Cerebral malaria coma scale established by Warrell *et al*, 1988 (14)

Table 2. Important pathological findings in the brain tissue of cerebral and noncerebral malaria

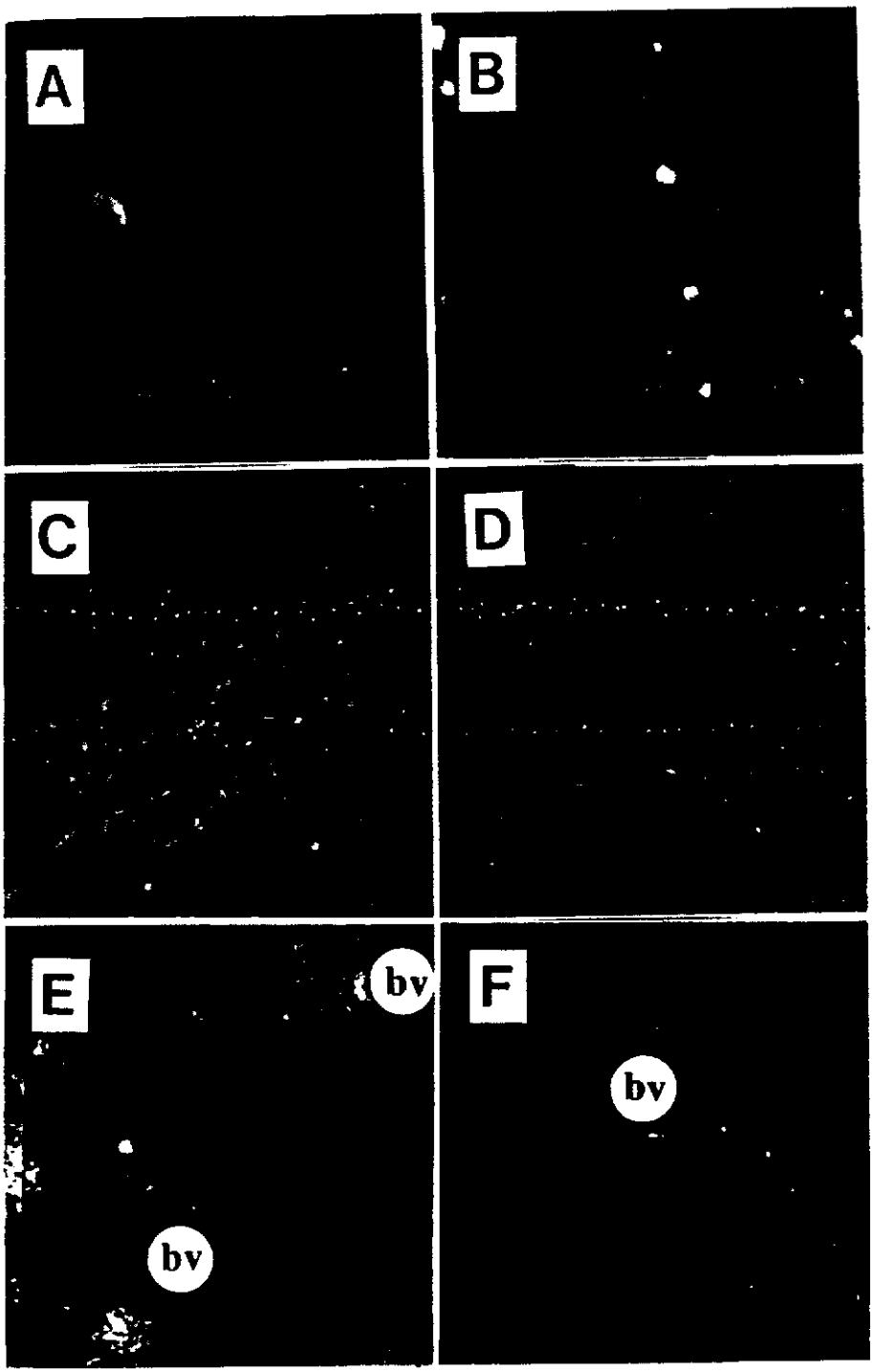
Group of severity	Parasitized red cell sequestration (% of microvessels)	Degree of edema	Ring haemorrhage	Mononuclear cell infiltration
Cerebral				
No.1	100	none	none	none
No.2	100	moderate	numerous	rare*
Noncerebral				
No.3	0	mild	none	none
No.4	0	none	none	none

Note: * Few mononuclear cells were found in brain parenchyma whereas numerous mononuclear cells were observed in some vessels.

Table 3. Cytokines in the brain tissues of cerebral and noncerebral malaria

Goup of severity	TNF-α	IFN-γ	IL-1β	IL-4	IL-10
Cerebral					
No.1	++	++	++	++	++
No.2	+++	+++	+++	+	++
Noncerebral					
No.3	+	+	+	++	+
No.4	-	+	+	++	+

Note: Cytokines are detected by indirect immunofluorescence assay as described in Material and Methods. Intensity of the staining was scored as - = no staining; + = weak; ++ = moderate; and +++ = strong staining.


A
B
C
D
E
bv
bv
F
bv