

Introduction

มะเร็งตับเป็นสาเหตุการตายอันดับนำของประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (1) มะเร็งตับชนิดที่พบอุบัติการณ์สูงและสัมพันธ์กับการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ มะเร็งท่อน้ำดี และพบอุบัติการณ์ในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง (2-7) การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการให้สารก่อมะเร็ง dimethyl nitrosamine (DMN) แก่หนูแฮมสเตอร์ที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับทำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ (8-9)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งมีปัจจัยเกี่ยวข้องของหลายประการ และแบ่งได้เป็น 3 ระยะคือ initiation, promotion และ progression (10) ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อระยะต่างๆ ของการเป็นมะเร็งเป็นได้ทั้งปัจจัยจากภายในร่างกายและจากภายนอกที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม กลุ่มของสารเคมีหลายชนิดมีผลต่อ DNA หรือ โครโมโซมโดยตรง จัดเป็น initiators ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนเป็น transformed cell ตัวอย่างสารเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ aromatic amines, Polycyclic aromatic hydrocarbons, nitroso compounds เป็นต้น สารเคมีกลุ่มที่สองเรียกว่า promotor มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งที่ต่ำมากหรือไม่เป็นเลย แต่สามารถเพิ่มอัตราการเป็นมะเร็งได้ ถ้าให้ร่วมกับ initiators สารเคมีกลุ่มนี้ไม่มีผลโดยตรงต่อ DNA แต่มีผลต่อ transformed cell ให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งเร็วขึ้น สารในกลุ่มนี้ได้แก่ phorbol ester แอลกอฮอล์ กรดน้ำดี กลีโกล และสาหร่ายทะเล เป็นต้น (11-12) สำหรับการศึกษาในคน มีรายงานว่า แอลกอฮอล์สามารถเพิ่มอัตราการเกิดมะเร็งปอดได้ เมื่อให้ร่วมกับสารก่อมะเร็ง DMN (13) แม้ว่าปัจจัยร่วมในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีของประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ผลทดลองในหนูแฮมสเตอร์ และการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีร่วมกับพฤติกรรมกรรมกรบริโภคปลาดิบ และการใช้ชีวิตประจำวันของประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (7-8, 14-17) ชี้แนะว่า นอกจากพยาธิใบไม้ตับแล้วปัจจัยร่วมอื่น น่าจะเป็นสารพิษที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อม และอาหาร การทดลองของวิทยาและคณะ (8, 14) พบว่า การมีพยาธิใบไม้ตับทำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์เร็วกว่าการได้รับ DMN อย่างเดียว อุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ชายสูงกว่าในผู้หญิง และผู้หญิงที่ช้ำยาคุมกำเนิดไม่แตกต่างจากผู้หญิงที่ไม่ได้ใช้ยาคุมกำเนิด (18-19) ดังนั้นการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ชายสูงกว่าผู้หญิง ไม่น่าจะเป็นปัจจัยจากระดับฮอร์โมนที่แตกต่างกัน แต่อาจเนื่องจากปัจจัยภายนอก โดยเฉพาะการดื่มสุราซึ่งมีแอลกอฮอล์อยู่ นอกจากนี้ผลจากการศึกษาระดับของเอนไซม์ของกลุ่มผู้ที่มีพยาธิใบไม้ตับพบว่า กลุ่มผู้ชายที่มีพยาธิใบไม้ตับมีระดับของเอนไซม์ gamma glutamyl transferase สูงกว่าคนปกติ (20) ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้เป็นตัวชี้สำคัญ สำหรับความผิดปกติของท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการดื่มสุรา (21-22) การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาผลที่ได้รับแอลกอฮอล์เมื่อให้ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ และสารก่อมะเร็ง DMN โดยเน้นการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลอง ขนาดและพยาธิสภาพของตับ เมื่อให้พยาธิใบไม้ตับและ หรือให้ร่วมกับสารก่อมะเร็ง DMN และ หรือให้ร่วมกับแอลกอฮอล์

การตรวจสอบเมตาโบลิซึมของตับ ทำได้หลายวิธีวิธีที่ต้องการศึกษาว่ามี free radicals จากการที่เซลล์ตับถูกทำลายเป็นอย่างไร อาจศึกษา reactive oxygen intermediate ที่ร่างกายกำจัดไม่ทันโดยการวัดในรูป lipid peroxidation products (LPP) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายแต่ไม่เฉพาะเจาะจงนัก มีรายงานการเปลี่ยนแปลงระดับ lipid peroxidation products ในภาวะที่เกิดการอักเสบ การแก่ชรา หรือติดเชื้อ (23-25) การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงต้องการตรวจสอบเมตาโบลิซึมของตับ ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับโดยการวัดออกมาในรูป LPP

Materials and methods

1. Chemicals Pepsin, Potassium Chloride Phosphoric acid, thiobarbitutic acid (Sigma), 1,1,3,3,-tetraethoxy propane (Sigma), สีสำหรับย้อม hematoxylin eosin, PAS, Masson trichrome, Congo red, formalin, ethyl alcohol, dimethylnitrosamine (DMN) sodium nembutal

2. สัตว์ทดลอง

หนูแฮมสเตอร์ (Syrian Golden Hamster) ต้นพันธุ์จาก Seato Medical Research Laboratory Center นำมาขยายพันธุ์ที่หน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ใช้เฉพาะเพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์

3. การเตรียม metcercaria ของพยาธิใบไม้ตับ

นำปลาประเภท cyprinoid ที่ซื้อจากตลาดในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดสกลนครมาเป็นละอียด และย่อยด้วยสารละลาย 1% pepsin ที่ 37 °C กรองและเก็บ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) โดยใช้ dissecting microscope ช่วยในการตรวจสอบและนับจำนวน

4. การให้พยาธิใบไม้ตับ และการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

สัตว์ทดลองกลุ่มที่ต้องได้รับพยาธิใบไม้ตับ ทำโดยการให้ metacercaria ที่เตรียมได้จากปลา cyprinoid ทาง intragastric tube ต่อจากนั้น 8-10 สัปดาห์ ตรวจสอบอุจจาระของสัตว์ทดลอง เพื่อหาไข่พยาธิในอุจจาระ

5. การศึกษาพยาธิสภาพของหนูแฮมสเตอร์

5.1 การเตรียมกลุ่มสัตว์ทดลอง หนูแฮมสเตอร์ เพศผู้อายุระหว่าง 7-8 สัปดาห์ แบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

- (1) กลุ่มควบคุม (control) ให้อาหารและน้ำปกติ
- (2) กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ (Ov) โดยให้ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับจำนวน 100 ตัว ทาง intragastric tube
- (3) กลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง (DMN) โดยใช้ dimethyl nitrosamine 1.3 ppm ผสมในน้ำดื่มให้เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์
- (4) กลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์ (EtOH) โดยผสมเอทิลแอลกอฮอล์ลงในน้ำดื่มให้เป็น 10% แอลกอฮอล์ ให้เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์
- (5) กลุ่มได้รับพยาธิใบไม้ตับ และ DMN (Ov+DMN) ให้ metacercaria จำนวน 100 ใบ ต่อมาอีก 2 สัปดาห์ จึงเริ่มให้ DMN 1.3 ppm เป็นเวลา 10 สัปดาห์
- (6) กลุ่มได้รับพยาธิใบไม้ตับ และ แอลกอฮอล์ (Ov+EtOH) ให้ metacercaria จำนวน 100 ใบ และต่อมาอีก 2 สัปดาห์ จึงเริ่มให้แอลกอฮอล์ 10% ในน้ำดื่มเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์
- (7) กลุ่มได้รับ DMN และแอลกอฮอล์ (DMN+EtOH) โดยผสม DMN 1.3 ppm และ แอลกอฮอล์ 10% ลงในน้ำดื่มให้เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์
- (8) กลุ่มได้รับ พยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และแอลกอฮอล์ (Ov+DMN+EtOH) เริ่มต้นให้ metacercaria จำนวน 100 ใบ ต่อมาอีก 2 สัปดาห์ ให้ DMN 1.3 ppm และ แอลกอฮอล์ 10% ผสมในน้ำดื่ม เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

5.2 การศึกษา growth rate ซึ่งนำหนูกหนูแฮมสเตอร์ทุกกลุ่มทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อดูลักษณะการเพิ่มน้ำหนักตัว ระยะ 2 สัปดาห์แรกที่ให้พยาธิใบไม้ตับ สารก่อมะเร็ง และแอลกอฮอล์ ซึ่งนำหนักอาหารและน้ำ โดยทำ 3 วันติดต่อกัน เพื่อหาค่าเฉลี่ยปริมาณอาหาร และน้ำที่หนูใช้ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

5.3 การตรวจสอบพยาธิสภาพของตับ เมื่อครบ 38 - 40 สัปดาห์ หลังจากเริ่มการทดลอง แล้วฆ่าหนูแฮมสเตอร์ทุกกลุ่ม

5.3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อตับ

เพื่อตรวจดูลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ และศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ โดยการฉีด sodium nembutal ขนาด 80 mg/kg body weight เข้าช่องท้อง จากนั้นผ่าท้องซึ่งน้ำหนักตับ เก็บตับและระบบท่อน้ำดี แช่ ใน 10% buffered formalin นำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยการตัด paraffin section หนาประมาณ 5-10 μm ย้อมด้วย hematoxylin-eosin, PAS, Masson trichrome, และ Congo red ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

5.3.2 การวัดขนาดท่อน้ำดี

วัดขนาดของท่อน้ำดีใน section ของตับจากหนูแต่ละกลุ่ม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาขนาด lumen ของ first order และ second order bile ducts ความหนาของ epithelium และ wall fibrosis หาค่าเฉลี่ยจากการวัด 3-5 ครั้งต่อตับหนูแต่ละตัวและแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของหนูแฮมสเตอร์แต่ละกลุ่ม

6. การเตรียม homogenate สำหรับตรวจหาระดับของ lipid peroxidation product (LPP)

6.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

6.1.1 Dose - response study

ใช้หนูแฮมสเตอร์เพศผู้ อายุประมาณ 7-8 สัปดาห์ จำนวน 5 กลุ่ม ให้ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ จำนวน 0, 10, 40, 80 และ 100 ใบ เลี้ยงไว้เป็นเวลา 3 เดือน

6.1.2 Time - course study

ใช้หนูแฮมสเตอร์เพศผู้อายุประมาณ 7-8 สัปดาห์ ให้ metacercaria จำนวน 100 ใบ เลี้ยงไว้เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 เดือน

6.2 การเตรียมส่วนสกัดตับ

นำหนูแฮมสเตอร์กลุ่มต่างๆ ตามข้อ 6.1 มาฉีดด้วย sodium nembutal ขนาด 80 mg/kg body weight เข้าทางช่องท้อง เพื่อให้หนูสลบ จากนั้นผ่าช่องท้อง perfused ด้วย cold 1.15% KCl นำตับออกมาซึ่งน้ำหนักบดให้ละเอียดโดย hand homogenizer ใช้ 1.15 % KCl ปริมาตร 3 เท่า น้ำหนักของตับ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 g, 10 นาที แยกส่วนใสไว้ตรวจหา LPP และหาโปรตีนโดยวิธีของ Lawry et al (26)

6.3 การตรวจวัดระดับ malonaldehyde

การตรวจหา LPP ในการทดลองนี้เป็นการวัดระดับ malonaldehyde โดยการทำให้เกิดสารประกอบที่มีสีโดยทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (27)

นำส่วนใสของตับ 0.5 ml ใส่ลงใน centrifuged tube เดิม 3 ml ของ 1% phosphoric acid และ 1 ml ของ 0.6 % thiobarbituric reagent ปิดฝาด้วยลูกแก้วนำไปต้มให้เดือดใน water bath เป็นเวลา 45 นาที นำมาทำให้เย็นลงโดยการแช่หลอดแก้วในน้ำเย็น จากนั้นเติม n-butanol จำนวน 4 ml ผสมให้เข้ากันอย่างแรงด้วย vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้นของ butanol ออกจากสารละลายอื่นๆ จากนั้นใช้ pipette ดูดชั้นบนของ butanol และนำไปวัด OD ที่ 535 และ 520 nm หาค่า $\Delta OD_{535-520}$ และนำไปคำนวณหา LPP โดยการเปรียบเทียบ กับ standard curve ที่ใช้ 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane เป็น standard

7. การวิเคราะห์ข้อมูล ค่าต่างๆ ที่รวบรวมได้ แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) \pm standard deviation (SD) การวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS ทำ one way analysis และ t-test ที่ความเชื่อมั่น 95%

Results

1. การเจริญเติบโตของสัตว์ทดลอง

จากการติดตามน้ำหนักของหนูแฮมสเตอร์แต่ละกลุ่มทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นระยะเวลา 30 สัปดาห์ ก่อนฆ่าหนูเพื่อศึกษา พยาธิสภาพนั้นพบว่า หนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ สารก่อมะเร็ง DMN และ แอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว หรือให้ร่วมกันทุกกลุ่ม มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลา 10 สัปดาห์แรก ที่เริ่มการทดลอง พบว่า หนูแฮมสเตอร์ กลุ่มที่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นต่ออาทิตย์เรียงจากน้อยไปหามาก คือ กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN < พยาธิใบไม้ตับร่วมกับ แอลกอฮอล์ < พยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และแอลกอฮอล์ < DMN ร่วมกับ แอลกอฮอล์อย่างเดียว, พยาธิใบไม้ตับอย่างเดียว และทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นน้อยกว่า กลุ่มควบคุม (รูปที่ 2) หนูแฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับเพียงอย่างเดียวหรือได้รับร่วมกับ DMN และ หรือ แอลกอฮอล์ เมื่อตรวจจุจากระของหนูแฮมสเตอร์เหล่านี้หลังจากเริ่มการทดลองไป 8-10 สัปดาห์ พบว่า มีไข่พยาธิใบไม้ตับในอุจจาระทุกตัว

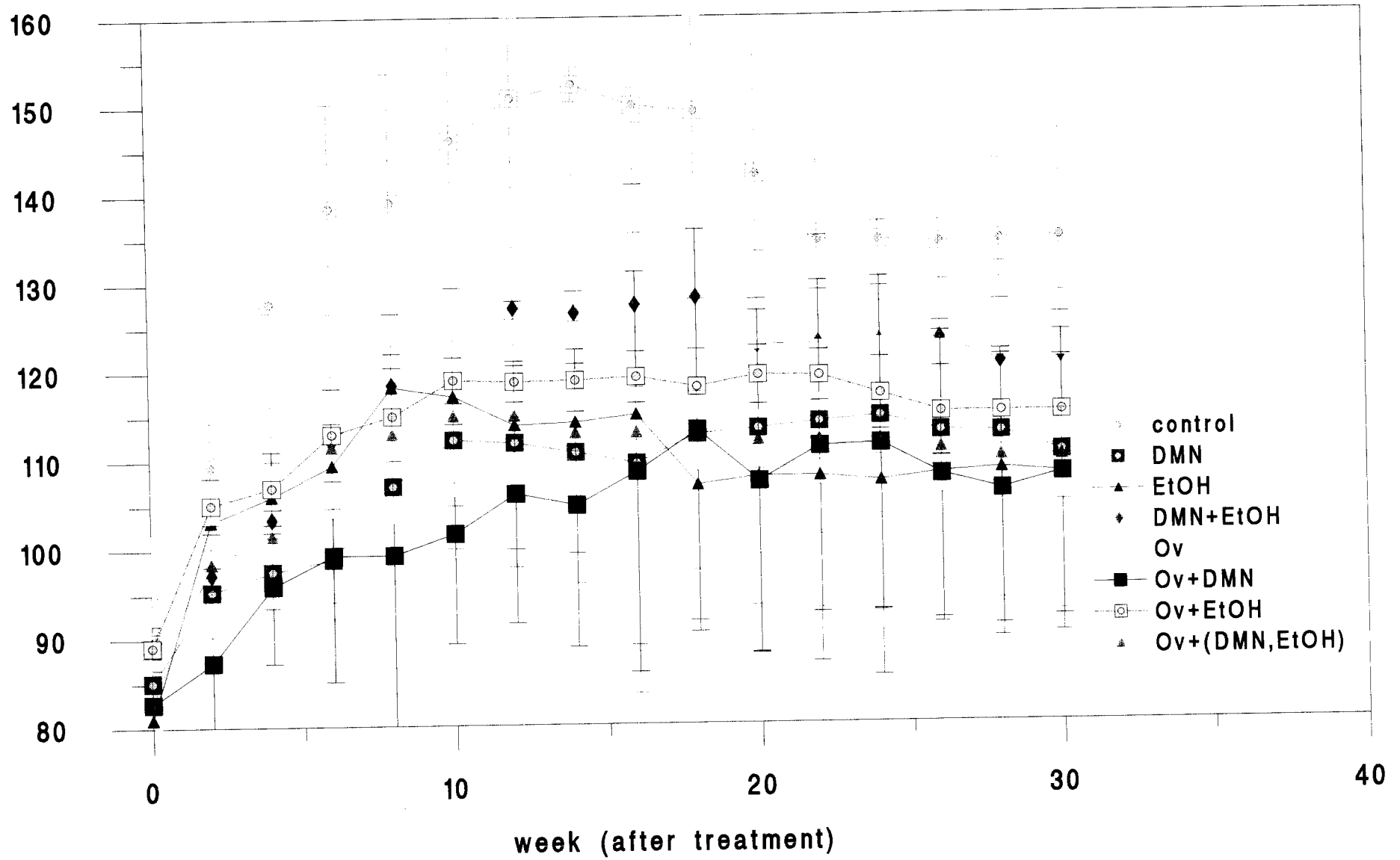
2. อัตราการอยู่รอดของสัตว์ทดลอง

การทดลองระยะแรกได้ใช้ DMN ผสมในน้ำดื่มในความเข้มข้น 6.5 ppm พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับ DMN 6.5 ppm ตายหมดภายใน 4 สัปดาห์แรกจากการทดลอง จึงลดขนาดลง พบว่า DMN 1.3 ppm มีผลให้ หนูแฮมสเตอร์ตายลดลง และเมื่อประมวลจำนวนหนูแฮมสเตอร์ที่ทดลอง ตลอดระยะเวลา 40 สัปดาห์ นั้นมี อัตราการอยู่รอด (survival rate) เรียงลำดับดังนี้ กลุ่มควบคุม > กลุ่มได้รับแอลกอฮอล์ > กลุ่มได้รับ DMN ร่วมกับแอลกอฮอล์ > กลุ่มได้รับพยาธิใบไม้ตับ > กลุ่มได้รับพยาธิใบไม้ตับ และแอลกอฮอล์ > กลุ่มได้รับ DMN > กลุ่มได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และแอลกอฮอล์ โดยที่กลุ่มควบคุมไม่มีหนูแฮมสเตอร์ตาย ตลอดการทดลอง หรือมีอัตราการอยู่รอดเป็น 100% (รูปที่ 3) นอกจากนี้แล้วพบว่าระยะที่ให้ DMN นั้น หนูแฮมสเตอร์กินอาหารและน้ำต่อวันน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่มได้รับ DMN อาหาร = 3.9-4.7 gm/100gm body weight, น้ำ = 3.9 - 4.5 gm/100gm body weight ; กลุ่มควบคุม อาหาร = 5-7 - 6.9 gm/100 gm body weight น้ำ = 5.8 - 6.8 gm/100 gm body weight) ส่วนหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับแอลกอฮอล์ดื่มน้ำมากขึ้น(อาหาร = 5.5 - 7.1 gm/100 gm body weight น้ำ = 9.2 - 9.7 gm/100gm body weight) กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และ แอลกอฮอล์ กินอาหารน้อยลง (อาหาร 3.4 -4.3 gm/100 gm body weight) และดื่มน้ำไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (คือ 5 - 7.8 gm/100 gm body weight) กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับอย่างเดียว กินอาหารและน้ำไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

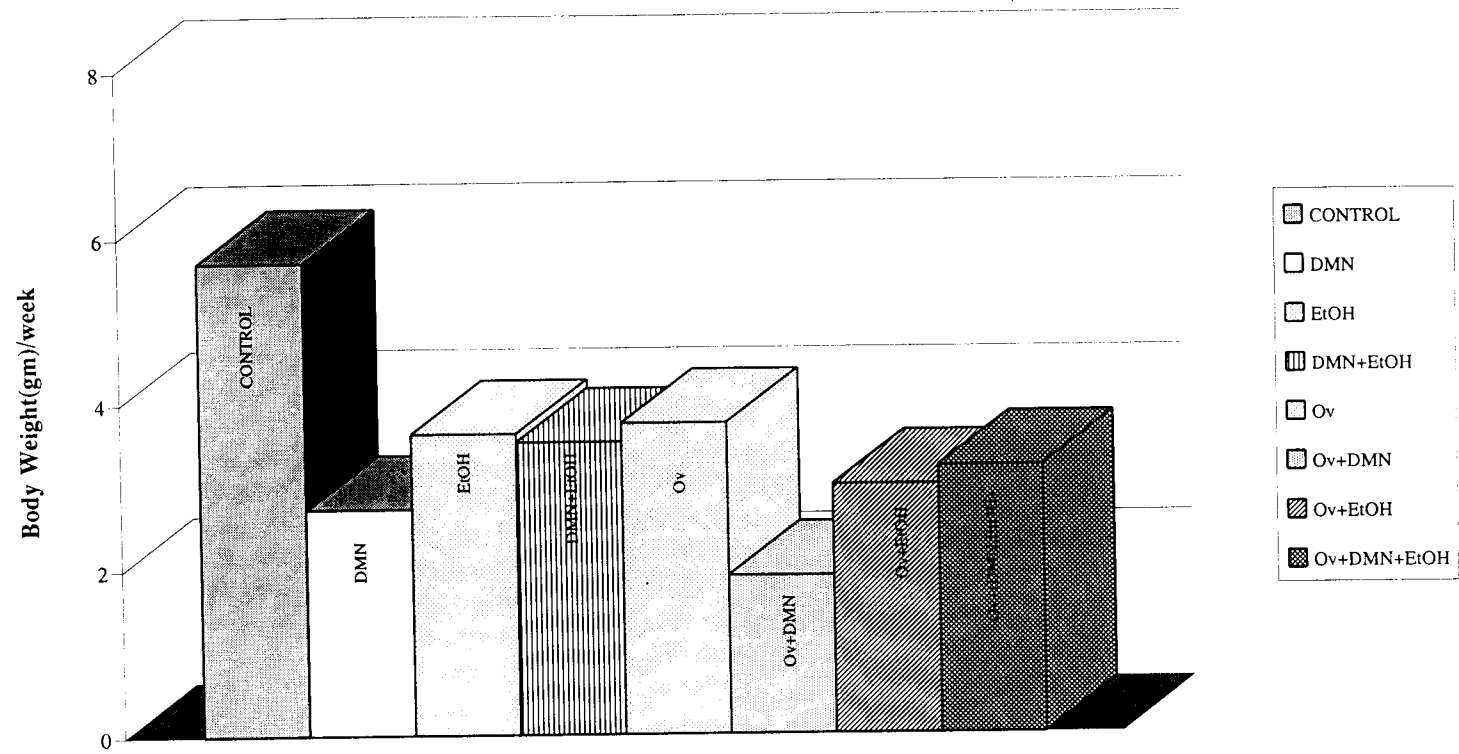
3. ลักษณะตับของหนูแฮมสเตอร์

เมื่อทำการทดลองถึงสัปดาห์ที่ 38-40 และฆ่าหนูแฮมสเตอร์ เพื่อนำตับมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทาง พยาธิสภาพนั้นพบว่า ลักษณะภายนอกตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับ DMN ซีดเล็กน้อย สำหรับกลุ่มที่ได้รับ แอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว หรือ กลุ่มที่ได้แอลกอฮอล์ร่วมกับ DMN มีขนาดตับโตขึ้น และสีซีด กลุ่มที่ได้รับ

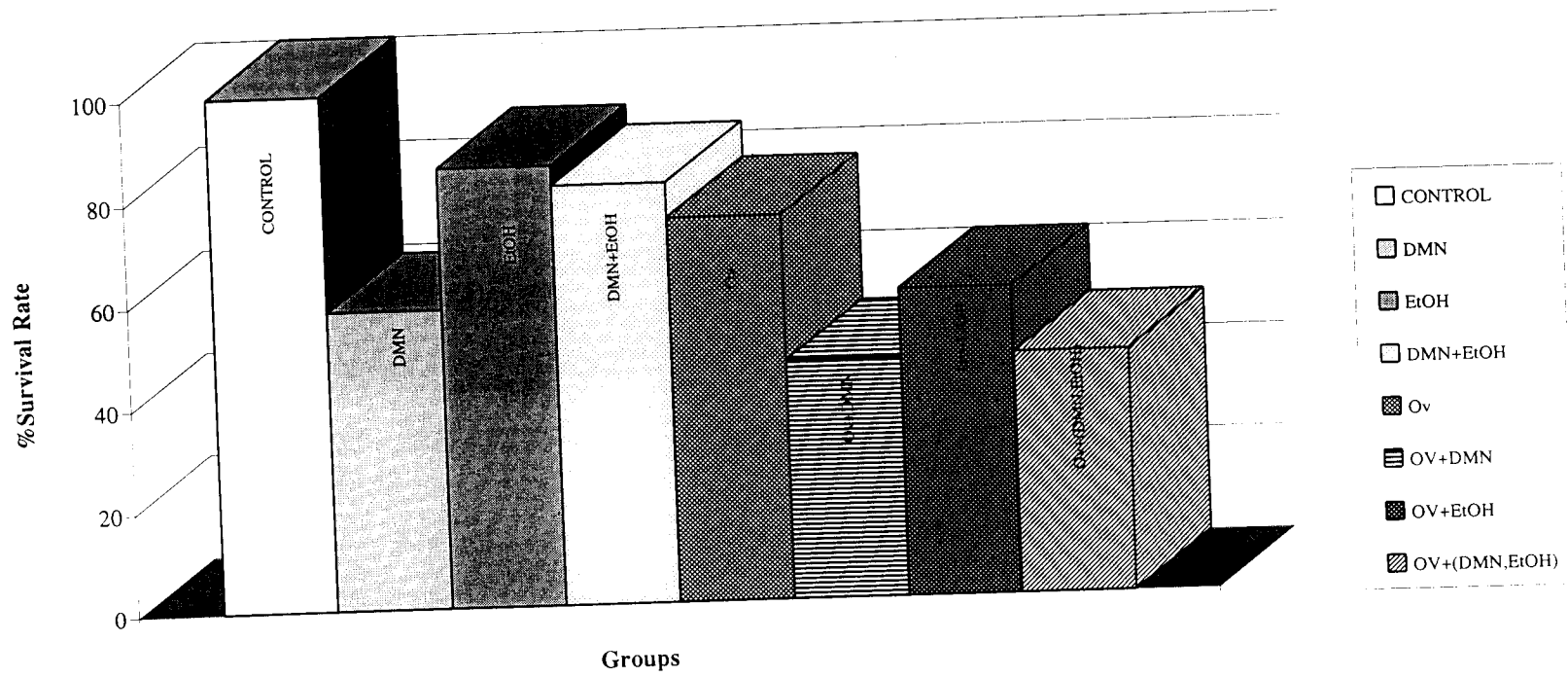
Body weight (gm)



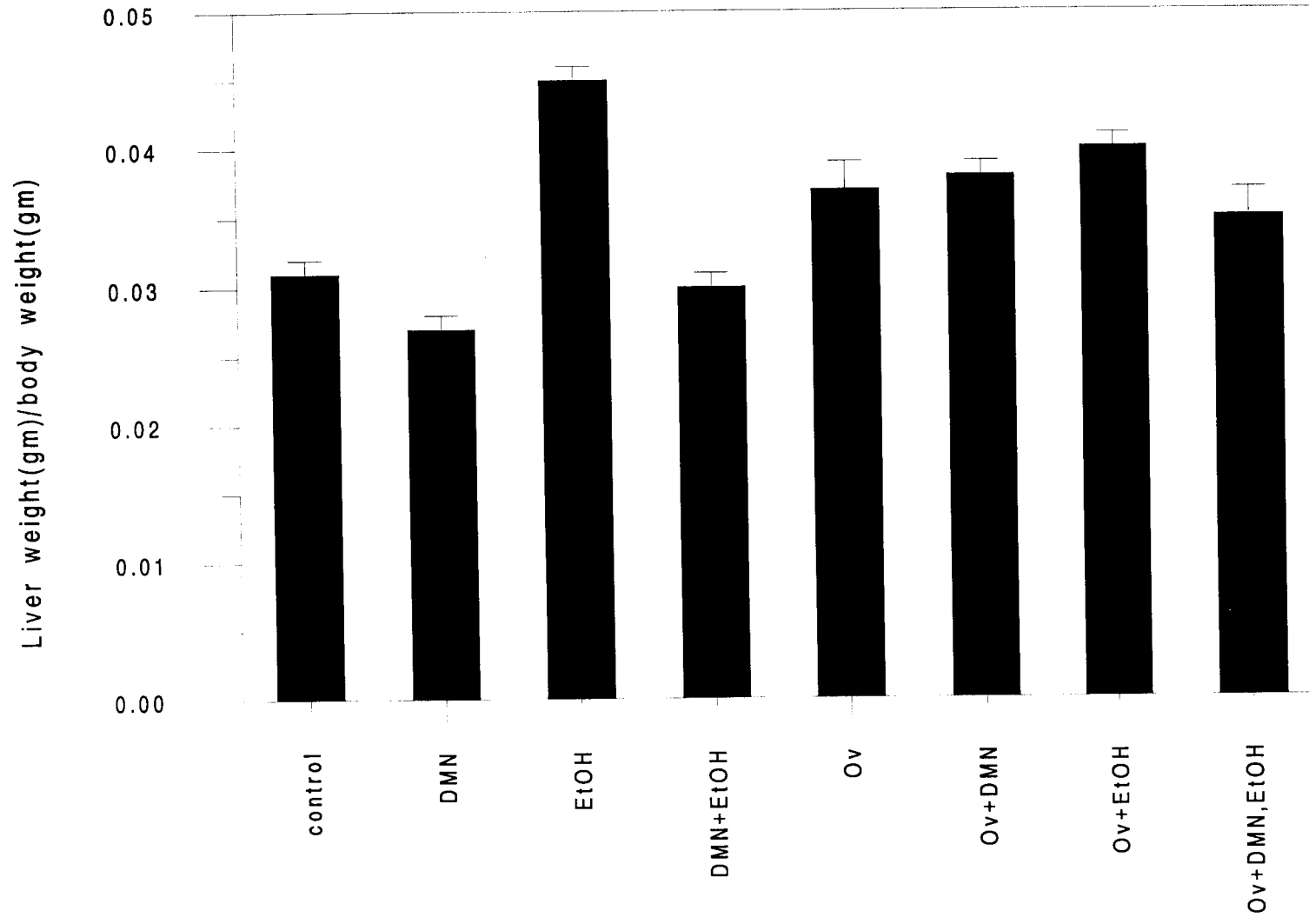
រូបភាព 1 GROWTH CURVE



รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเพิ่มขึ้นภายใน 10 สัปดาห์หลังการทดลอง



รูปที่ 3 อัตราการอยู่รอดของหนูแฮมสเตอร์กลุ่มต่าง ๆ



รูปที่ 4 น้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัวต่อน้ำหนักตัวของหนูแฮมสเตอร์กลุ่มต่าง ๆ



พยาธิใบไม้ตับ หรือ ร่วมกับการได้รับ DMN และหรือแอลกอฮอล์ ลักษณะมีวักตับจะไม่เรียบ และมี bile duct dilate เป็นตุ่มเล็กๆ (fine nodularity) กระจายไปทั่วตับการเปลี่ยนแปลงนี้พบเพิ่มมากขึ้นตามลำดับจากพยาธิใบไม้ตับอย่างเดียวไปจนถึงพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และแอลกอฮอล์ ประมาณ 20% ของหนูแฮมสเตอร์เหล่านี้ พบมีหนองฝีสีขาวยบริเวณใต้แคปซูลตับขนาดตั้งแต่ 0.2 - 0.6 เซนติเมตรด้วย

การเปรียบเทียบน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัวของหนูแฮมสเตอร์กลุ่มต่าง ๆ พบว่า กลุ่มที่มี น้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มควบคุมคือ กลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์ > กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับแอลกอฮอล์ > กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN > กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และแอลกอฮอล์ โดยกลุ่มที่ได้รับ DMN ร่วมกับแอลกอฮอล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มที่ได้รับ DMN มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 4)

4. การเปลี่ยนแปลงที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์

4.1 กลุ่มที่ได้รับ DMN อย่างเดียว

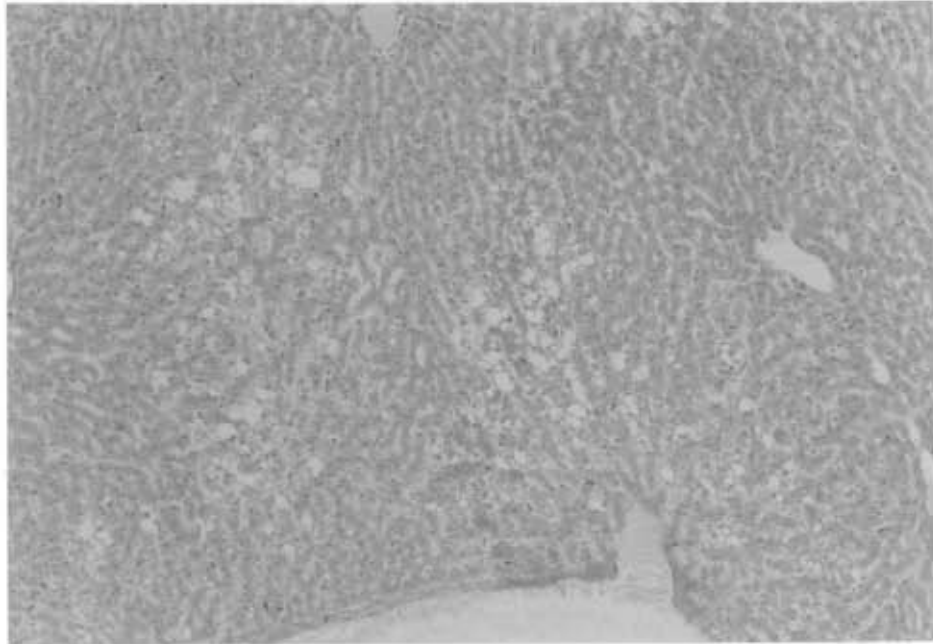
การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตับที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ของหนูแฮมสเตอร์ในกลุ่มนี้อยู่ที่เซลล์ตับ ลักษณะโครงสร้างของ lobular architecture และ bile duct ไม่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนนักการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของเซลล์ตับที่พบ คือ fatty change แบบ microvesicle ในซัยโตพลาสซึมของเซลล์ตับโดยทั่วๆ ไป ร่วมกับแบบ fat droplets. ซึ่งเกิดเป็นหย่อมๆ รอบๆ portal vein ขนาดใหญ่ (รูปที่ 5 และ 6) และมี kupffer's cell hypertrophy และ sinusoid ขยายตัวกว้างออก การเปลี่ยนแปลงนี้พบกระจายทั่วไปทั้งตับ และนอกจากนี้ยังพบกลุ่มของ bile duct ขนาดเล็กมีการเพิ่มจำนวนและโป่งออกเป็น cyst ขนาดเล็ก และมักอยู่ในส่วนปลายของพูตับ nuclear atypia ของเซลล์ตับพบได้บ้างประปราย การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้พบในหนูแฮมสเตอร์ทุกตัว แต่ความรุนแรงต่างกันเล็กน้อย

4.2 กลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว

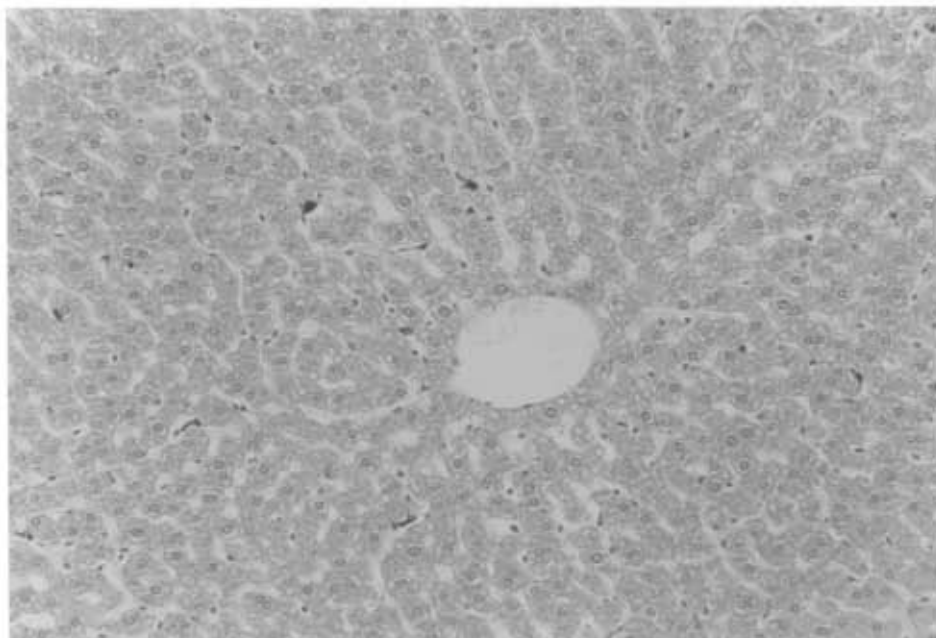
การเปลี่ยนแปลงของตับมีลักษณะที่เรียกว่า alcoholic hepatitis เหมือนกันหมดทุกตัว เพียงแต่ระดับความรุนแรงต่างกันบ้างเล็กน้อย

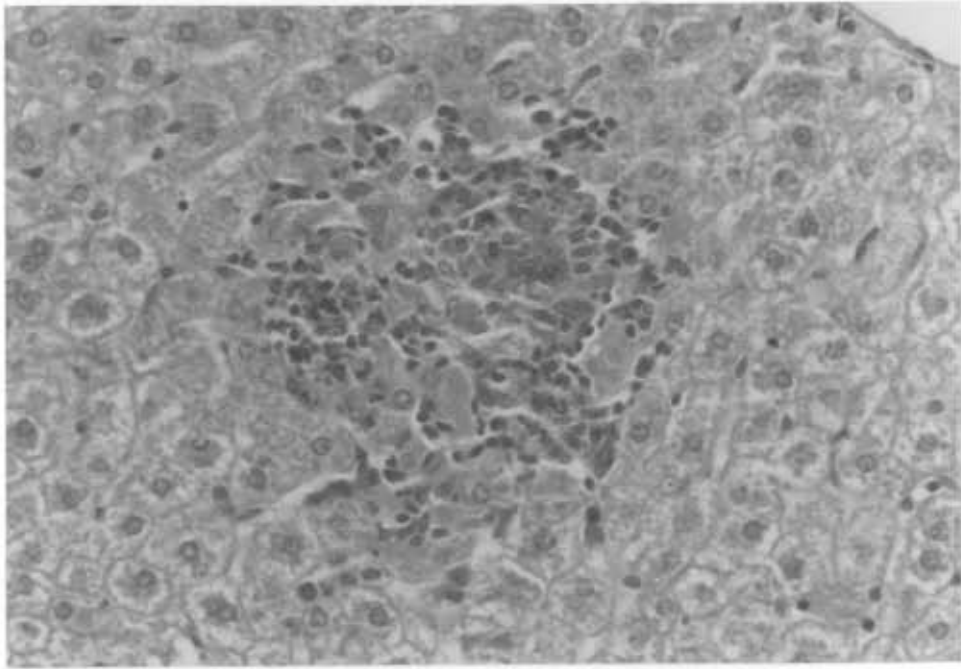
ลักษณะของพยาธิสภาพที่เห็น คือ มีการเน่าตายของเซลล์ตับ (focal necrosis) (รูปที่ 7) เป็นกลุ่มเล็กๆ และมีเซลล์นิวโทรฟิลส์ล้อมรอบ ส่วนเซลล์ตับอื่นๆ จะบวม ซัยโตพลาสซึมเป็นช่องโหว่ ขอบเขตไม่ชัดเจน บริเวณรอบๆ นิวเคลียส ซัยโตพลาสซึมจับเป็นก้อนสีแดงๆ เซลล์ตับบวมมากจนเบียด sinusoid ให้ตีบแคบ ทำให้ลักษณะของ lobular architecture เสียไป (รูปที่ 7-9) สำหรับ Mallory bodies นั้นพบได้บ้างและมักพบในบริเวณกลุ่มเซลล์ตับที่เน่าตาย (รูปที่ 7) และในบริเวณที่เกิด lipogranuloma (รูปที่ 9) ซึ่งประกอบด้วย giant cells ที่มี fat lobule ในซัยโตพลาสซึม เซลล์ตับที่เน่าตาย มีเซลล์ลิมโฟซัยท์ เซลล์พลาสมา และ มาโครฟาจ มาล้อมรอบ

Fatty change ของเซลล์ตับพบน้อยมาก และมักเป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่ใกล้ portal vien ขนาดใหญ่

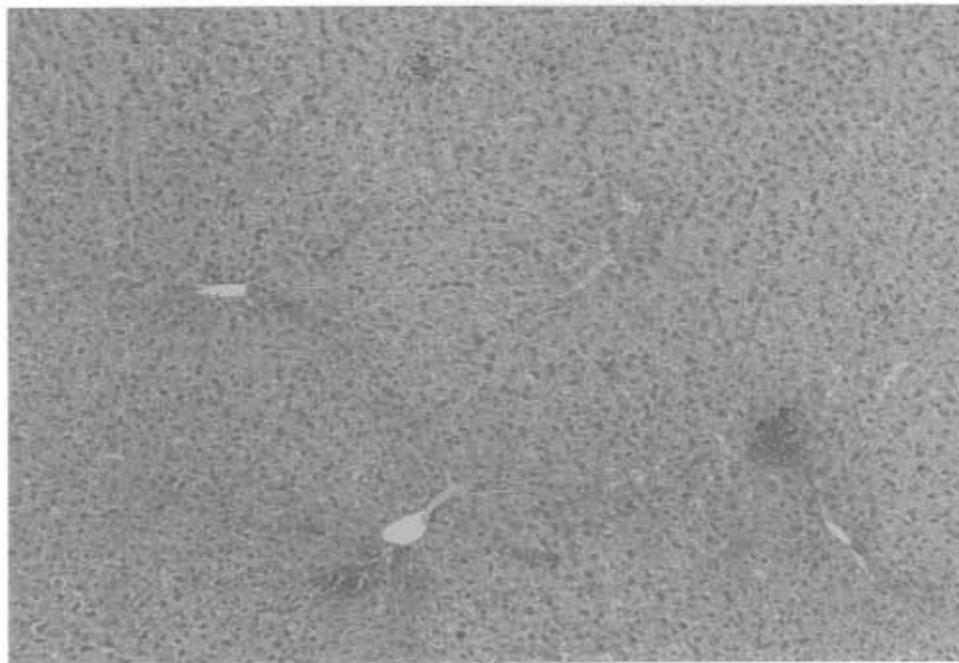


รูปที่ 5-6 เนื้อเยื่อตัวหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับสารก่อมะเร็ง DMN ในน้ำดื่ม 1.3 ppm (ขยาย 25 เท่า และ ขยาย 50 เท่า)
พบเซลล์ที่มีการบวมขึ้น





รูปที่ 7 เนื้อเยื่ออัณฑะหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับแอลกอฮอล์ 10% ผสมในน้ำดื่ม (ขยาย 100 เท่า)
พบหย่อมการอักเสบและการเน่าตาย



รูปที่ 8 เนื้อเยื่ออัณฑะหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับแอลกอฮอล์ 10% ผสมในน้ำดื่ม (ขยาย 25 เท่า)
พบเซลล์อัณฑะบวมโตและมีการเน่าตายเป็นหย่อมๆ

ไฟโบรซิสของ bile duct และ portal area ยังเห็นไม่ชัดเจนนัก การเปลี่ยนแปลงของ bile ducts ขนาดเล็กไม่พบในกลุ่มนี้

4.3 กลุ่มที่ได้รับ DMN ร่วมกับแอลกอฮอล์

การเปลี่ยนแปลงของตับมีลักษณะคล้ายคลึงกับกลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว แต่ระดับความรุนแรงน้อยกว่า พบกลุ่มเซลล์ตับที่เกิดเน่าตาย และ lipogranuloma น้อยกว่า ความผิดปกติของนิวเคลียสของเซลล์เช่น นิวเคลียสขนาดโตผิดปกติ และเซลล์ซึ่งมี 2-3 นิวเคลียส พบได้บ่อยขึ้น (รูปที่ 10)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ bile ducts ทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่รวมทั้ง portal area ไม่พบในกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน

4.4 กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับเพียงอย่างเดียว

ในกลุ่มนี้ lobular architecture ของตับจะเสียไปมาก การเปลี่ยนแปลงที่เป็นจุดเด่นของตับหนูแฮมสเตอร์ในกลุ่มนี้คือ 1st และ 2nd order bile duct มีขนาดโตขึ้นมาก(ตารางที่ 1) ผนังของ bile ductหนาขึ้นเนื่องจากมี periductal fibrosis และล้อมรอบด้วย เซลล์การอักเสบซึ่งประกอบด้วยเซลล์ อิโอสินในฟิลล์ ลิมโฟไซต์ และเซลล์พลาสมา พบเซลล์เบซิฟิลล์ในส่วนต้นใกล้ๆ cystic duct บ้างเล็กน้อย พบตัวปรสิต bile duct ที่ขยายใหญ่ขึ้นด้วย (รูปที่ 11) ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของ epithelium lining ที่แบนลง เกิด hyperplasia และ mucinous metaplasia

Bile duct ขนาดเล็กมีการเพิ่มจำนวน มี fibrosis และเซลล์การอักเสบแบบเรื้อรังอยู่รอบๆ บางบริเวณมี bridging fibrosis ด้วยการเปลี่ยนแปลงนี้พบบริเวณใกล้ๆ และได้ต่อบริเวณที่มีการโป่งพองของ duct จากการที่มีปรสิตอยู่ ถ้าเป็นปลายของตับมักจะมีการผอมของเซลล์ตับร่วมด้วยในหนูบางตัวจะพบ มี granulomatous inflammation ในบริเวณที่มีไข่ของพยาธิใบไม้ตับและยังพบมีการอักเสบรอบๆ และภายใน bile duct บริเวณใกล้เคียงด้วย

4.5 กลุ่มที่ได้รับ พยาธิใบไม้ตับ และ DMN

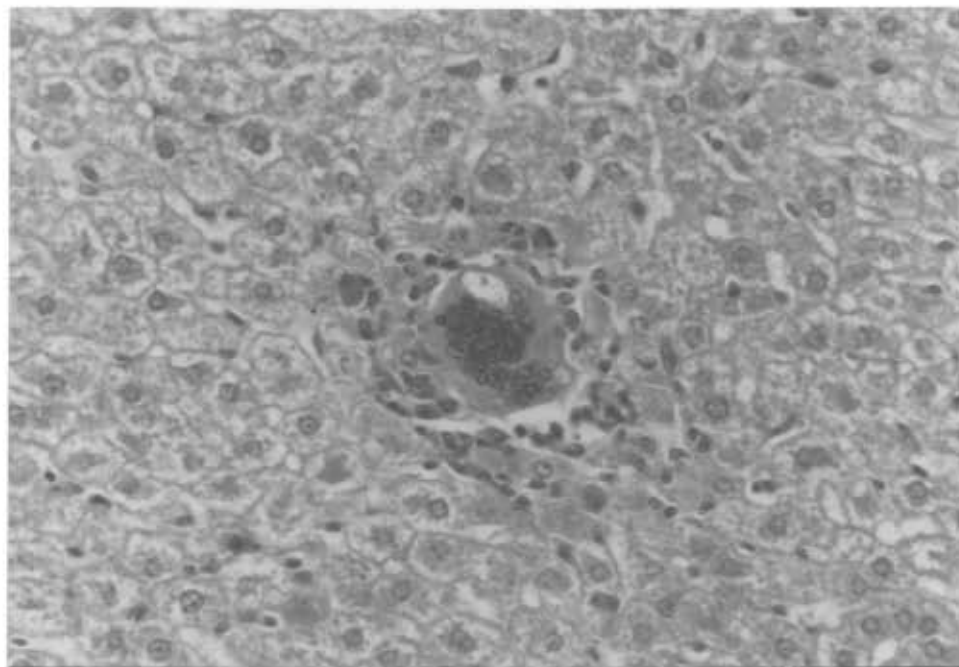
มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง biliary system และ liver parenchyma การเปลี่ยนแปลงของ biliary system คล้ายกับในกลุ่มที่ได้รับ พยาธิใบไม้ตับ เพียงอย่างเดียว ความรุนแรงไม่แตกต่างกันมากนัก

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ liver parenchyma พบมี bridging necrosis อย่างชัดเจน ในบริเวณพุด้านส่วนปลายได้ต่อ bile duct ขนาดใหญ่ที่มีตัวปรสิตอยู่ พบว่าเมื่อย้อมด้วย Congo red มีบางตัวที่มีการสะสมของสาร amyloid อยู่ (รูปที่ 12) นอกจากนี้ bile duct ขนาดเล็กมีการเพิ่มจำนวนโป่งพองออก และมีการอักเสบร่วมด้วย (รูปที่ 13) และยังพบมี cystic cholangioma ขนาดใหญ่กว่า และปริมาณมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับ DMN เพียงอย่างเดียว

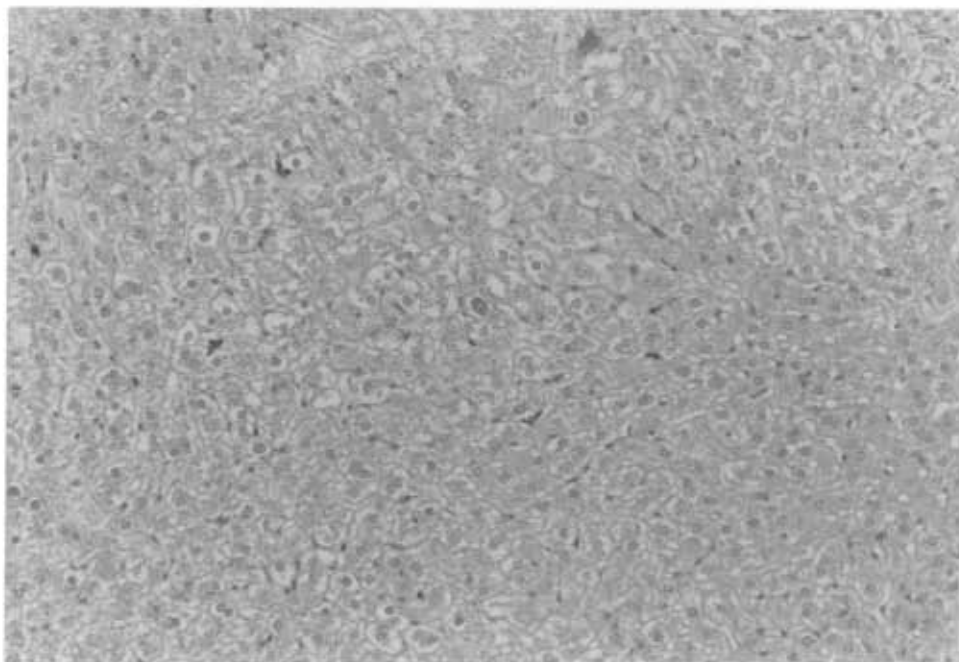
สำหรับ granulomatous inflammation รอบไข่ของปรสิตและการอักเสบของ bile duct มีความรุนแรงมากกว่า

4.6 กลุ่มที่ได้รับ พยาธิใบไม้ตับร่วมกับแอลกอฮอล์

การเปลี่ยนแปลงจะประกอบด้วยเปลี่ยนแปลงที่เกิดจาก พยาธิใบไม้ตับร่วมกับผลของแอลกอฮอล์ การเปลี่ยนแปลงของ bile ducts ขนาดใหญ่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับอย่างเดียว และกลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN มากนัก สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับจากแอลกอฮอล์ก็ไม่ต่างจากกลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 9 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับแอลกอฮอล์ 10% ผสมในน้ำดื่ม (ขยาย 100 เท่า)
แสดง lipogranuloma ที่เกิดขึ้น

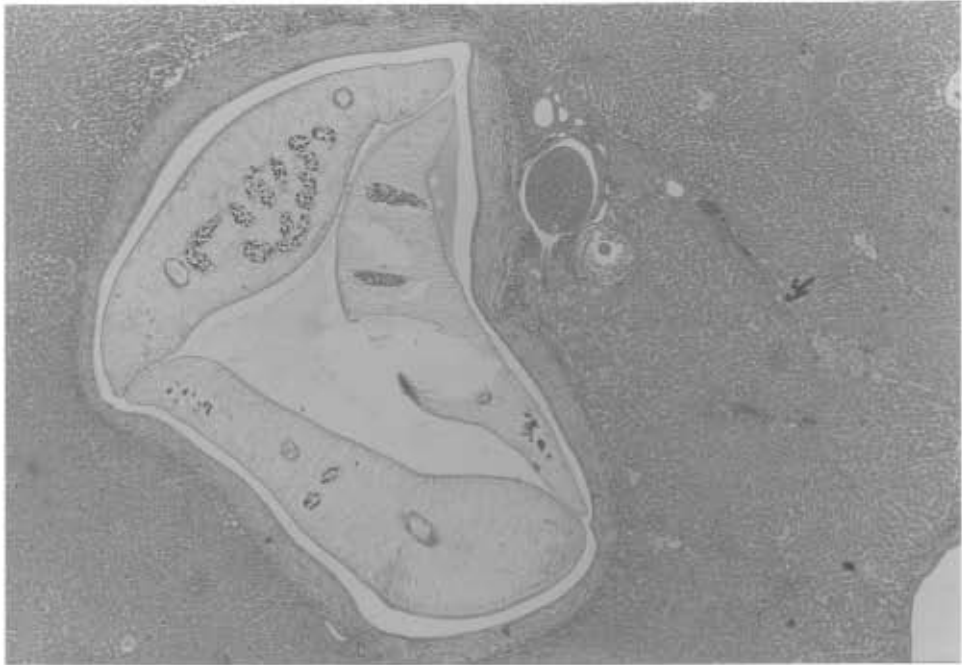


รูปที่ 10 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับ DMN 1.3 ppm ร่วมกับแอลกอฮอล์ 10% ในน้ำดื่ม (ขยาย 50 เท่า)
พบเซลล์ตับมี นิวเคลียสผิดปกติ (nuclear atypia) บางเซลล์มี 2-3 นิวเคลียส และเซลล์บวมน้ำ
คล้ายกับรูปที่ 8

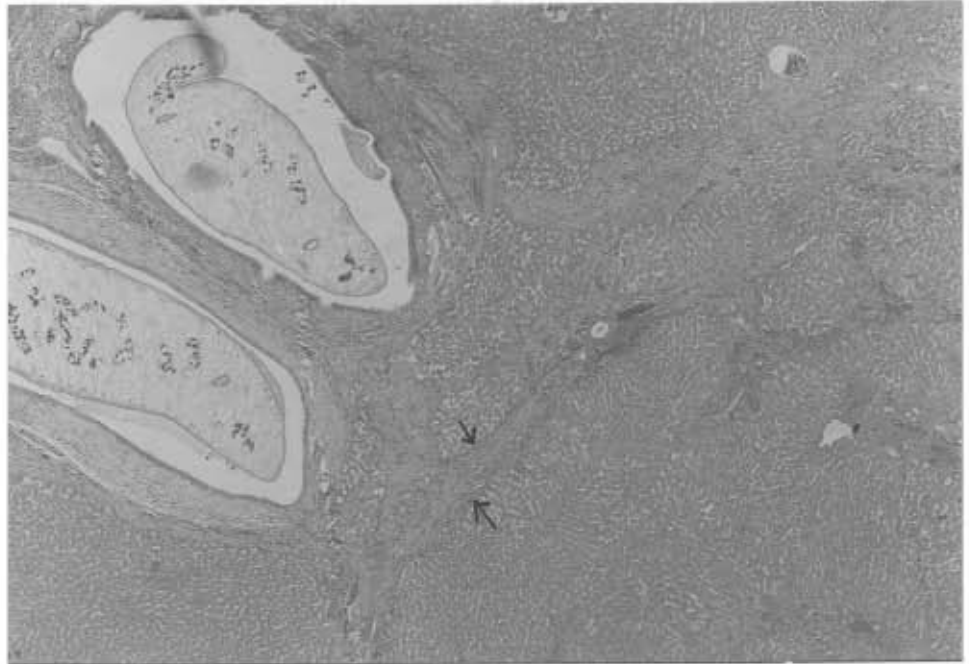
ตารางที่ 1 ขนาดของ bile ducts ของหนูแฮมสเตอร์ในกลุ่มต่างๆ *

groups	diameter ของ lumen (mm)		ความสูงของ epithelium (mm)		ความหนา ของ fibrosis (mm)	
	1 st order	2 nd order	1 st order	2 nd order	1 st order	2 nd order
Control (n=3)	0.870	0.110	0.085	0.080	0.270	0.100
Ov (n=6)	4.390	3.405	0.228	0.125	0.650	0.540
DMN(N=5)	0.878	0.488	0.075	0.080	0.126	0.066
EtOH(n=6)	0.665	0.375	0.093	0.083	0.108	0.083
Ov+DMN (n=6)	3.950	2.550	0.460	0.020	0.460	0.430
Ov+EtOH (n=3)	3.300	2.760	0.314	0.260	0.570	0.510
DMN+EtOH (n=6)	0.729	0.450	0.064	0.056	0.160	0.069
Ov + DMN +EtOH (n=9)	2.966	2.807	0.387	0.270	0.477	0.433

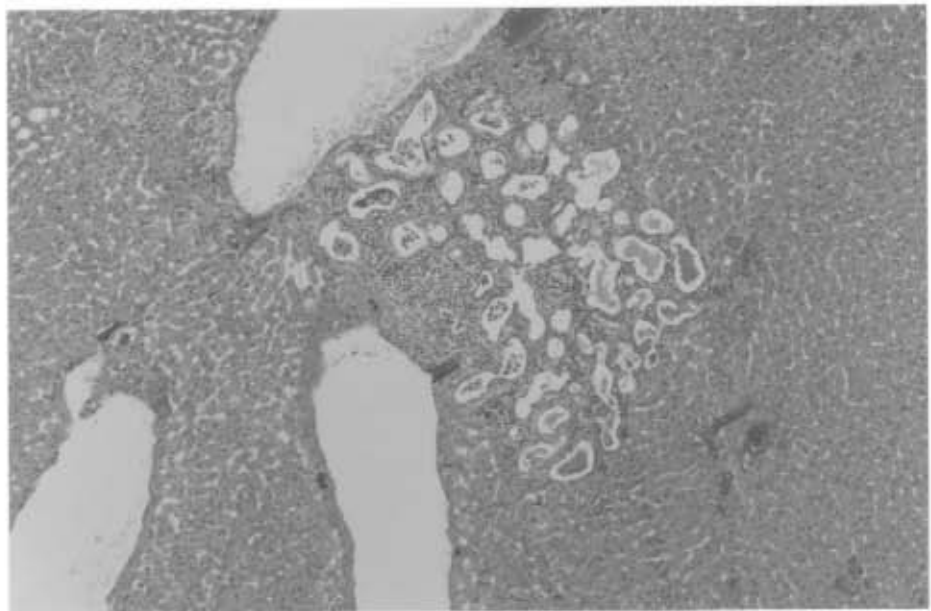
* ค่าเฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm) วัดจากทุก sections ที่พบ bile ducts และวัด 3-5 ครั้ง เป็นอย่างน้อย
n = จำนวนหนูแฮมสเตอร์ที่นำมาวัดค่าต่างๆ



รูปที่ 11 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercaria (ขยาย 50 เท่า)
ท่อน้ำดีมีขนาดใหญ่และมีปรสิตอยู่ ภายใน เกิด bridging fibrosis และการอักเสบรอบท่อน้ำดี
(↑) เซลล์เยื่อท่อน้ำดีเกิด hyperplasia มีการงอกเพิ่มจำนวนของท่อน้ำดีขนาดเล็ก



รูปที่ 12 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercaria ร่วมกับ DMN1.3 ppm(ขยาย 25 เท่า) มีปรสิตอยู่ในท่อน้ำดีเกิด bridging necrosis (↑) ระหว่าง portal tract และระหว่าง portal tract และ central tract



รูปที่ 13 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercaria ร่วมกับ DMN 1.3 ppm (ขยาย 10 เท่า) แสดงบริเวณที่มี cystic cholangioma

การเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากในกลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์ และกลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ คือ มี bile duct ขนาดเล็กเพิ่มจำนวนและมี fibrosis รอบๆ เริ่มมี bridging fibrosis ระหว่าง portal triad และระหว่าง portal triad กับ central vein มากขึ้น และมี การแทรกซึมของเซลล์การอักเสบบ้างเล็กน้อย (รูปที่ 14 และ 15)

4.7 หนูกลุ่มที่ได้รับ พยาธิใบไม้ตับร่วมกับ DMN และแอลกอฮอล์

เนื้อตับบริเวณที่มีพยาธิสภาพถูกทำลายไป มีการงอกเพิ่มจำนวนของ bile ducts ขนาดเล็กจำนวนมาก มีการเกิดไฟโบรซิสรอบๆ เกิด cholangiofibrosis (รูปที่ 16-17) และบางแห่งมีขนาดใหญ่จนกลายเป็น cholangiofibroma บางบริเวณจะมี bridging fibrosis รอบ liver lobule กลายเป็น cirrhosis

สำหรับเซลล์ตัวเองจะเกิด hyperplastic nodules ซึ่งเป็น precancerous lesions อีกด้วยความแตกต่างในขนาดของท่อน้ำดี epithelial change และ bridging fibrosis คล้ายกับกลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ

4.8 กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับร่วมกับการให้ DMN พร้อมกับแอลกอฮอล์

เนื้อตับมีบริเวณที่ถูกทำลายมากขึ้นมีนัยของการเกิด cholangiofibroma และ cholangiofibrosis เป็นบริเวณกว้างกว่ากลุ่มที่ได้รับ พยาธิใบไม้ตับ, กับ DMN และ พยาธิใบไม้ตับกับแอลกอฮอล์ มี atypical cell และ hyperplastic nodule มีบริเวณกว้างขึ้น (รูปที่ 18-19)

ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2 สรุปความแตกต่างของสภาพและขนาดท่อน้ำดีและพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในหนูแฮมสเตอร์ กลุ่มต่างๆ

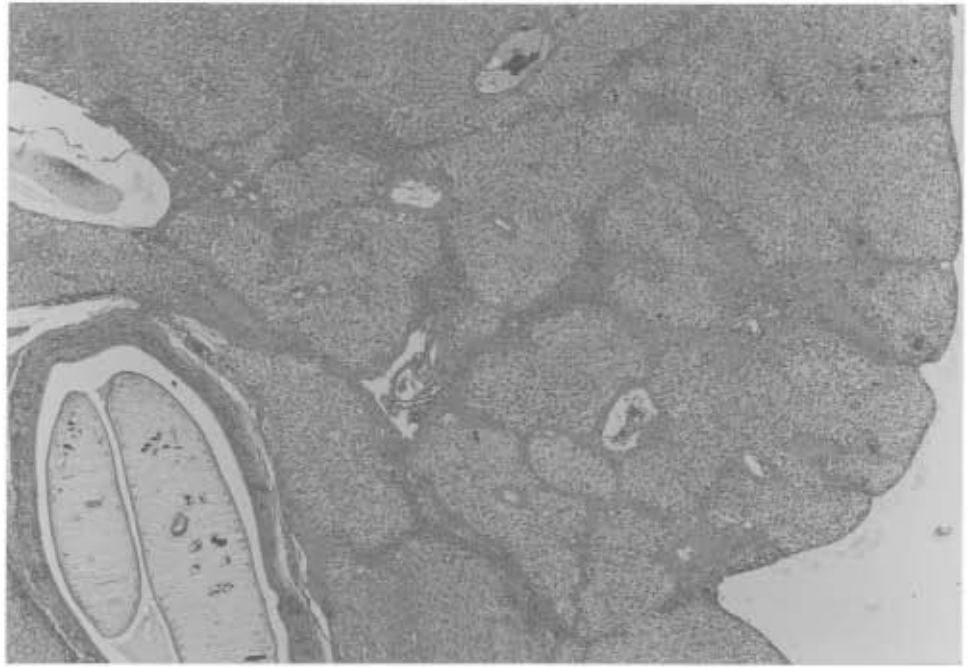
5. ระดับ lipid peroxidation product (LPP) ในตับ

5.1 Dose - response study

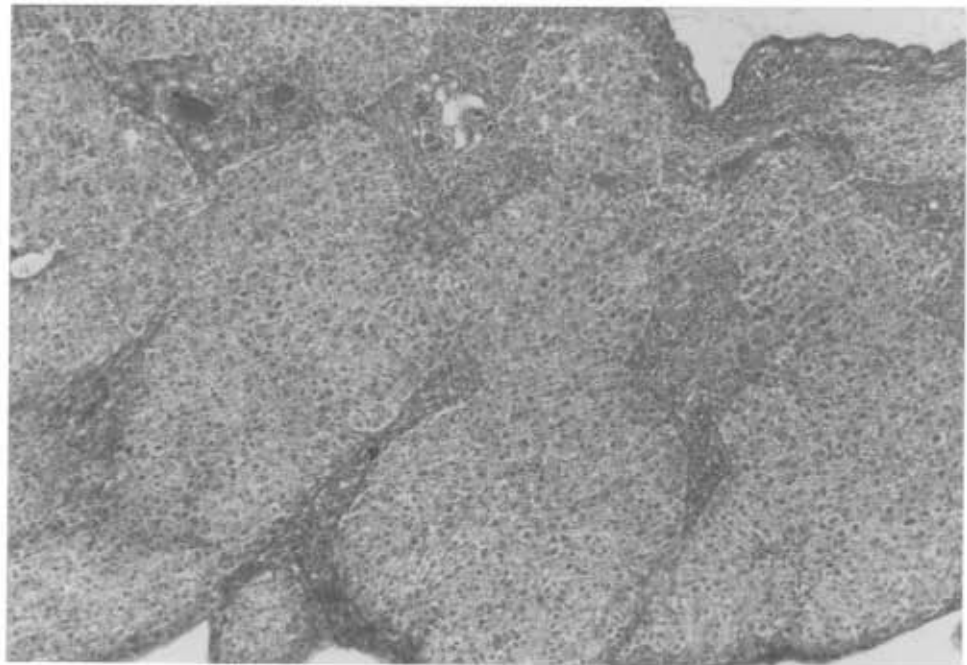
การตรวจวัดระดับ lipid peroxidation product ในรูป malonaldehyde ในตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ให้พยาธิใบไม้ตับจำนวน 10, 40, 80, 100 นั้นพบว่า ระดับของ LPP ต่ำกว่าตับของหนูแฮมสเตอร์ ที่ไม่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ และเมื่อได้รับจำนวน metacercaria เพิ่มขึ้นค่า LPP ยิ่งลดลง (รูปที่ 20)

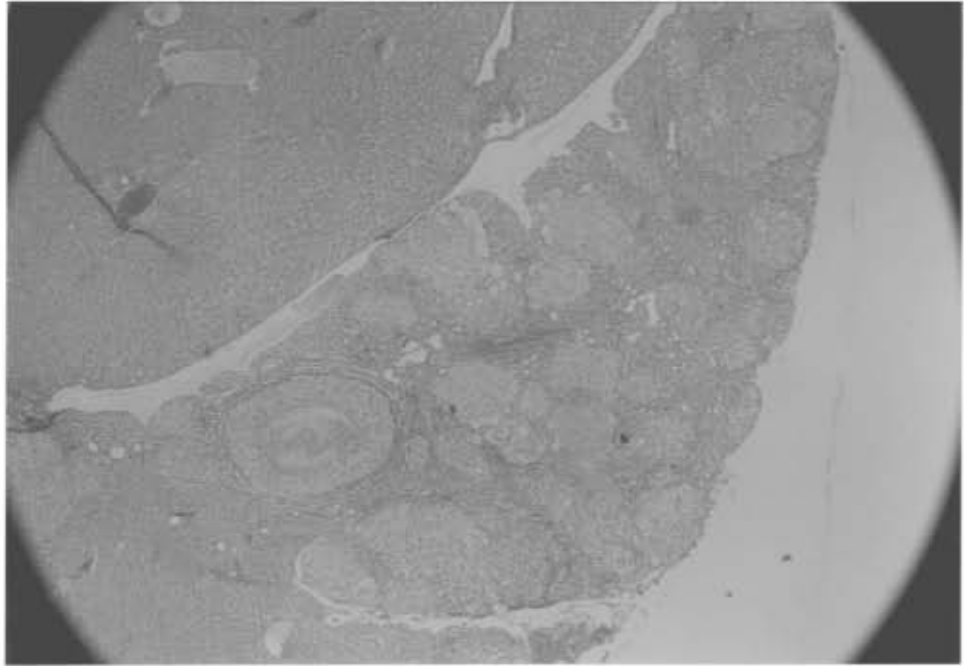
5.2 Time course study

ระดับของ LPP ในหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับจำนวน 100 metacercaria มีค่าลดลงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับพยาธิใบไม้ตับและเมื่อระยะเวลาที่ให้พยาธิใบไม้ตบนานขึ้น กลุ่มที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับยังมีค่า LPP ในตับลดต่ำอย่างมาก (รูปที่ 21)

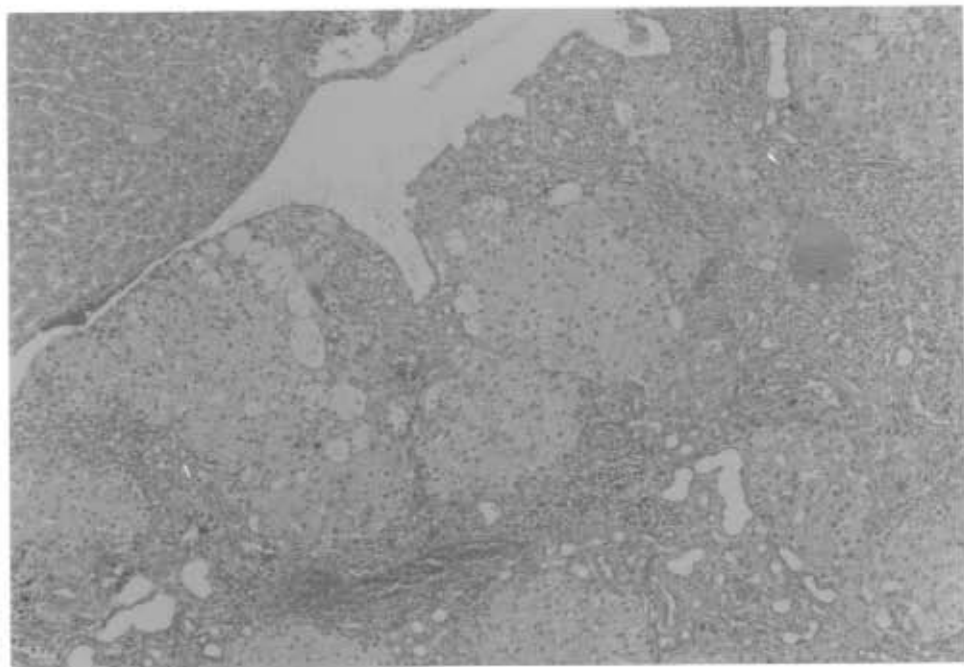


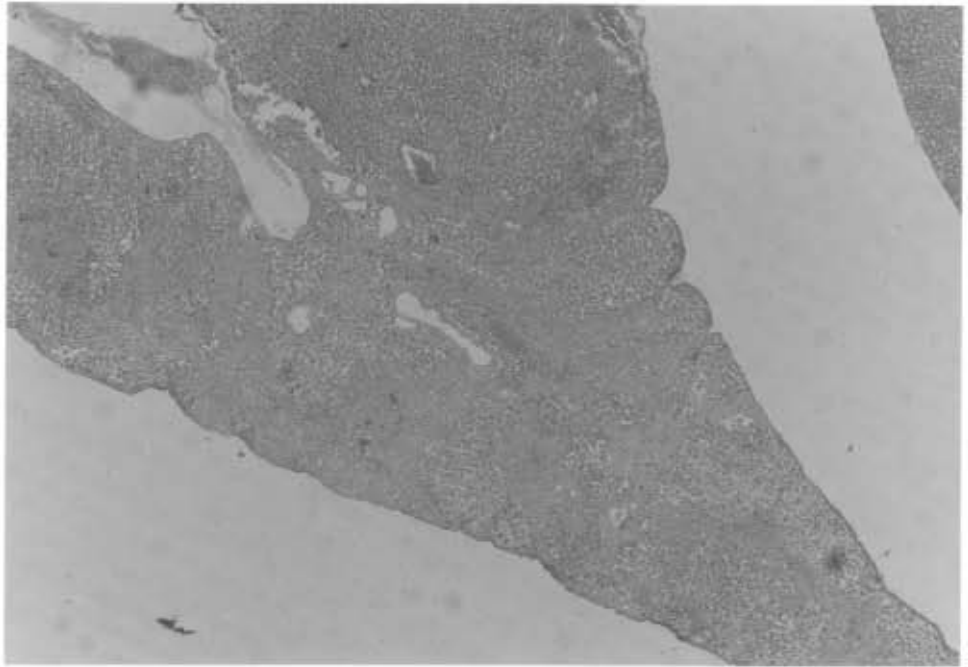
รูปที่ 14-15 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercaria และแอลกอฮอล์ 10% (ขยาย 10 เท่า และ ขยาย 25 เท่า)
พบมี bridging fibrosis, periportal fibrosis , Cholangiofibroma และการแทรกซึมของเซลล์ที่อักเสบ



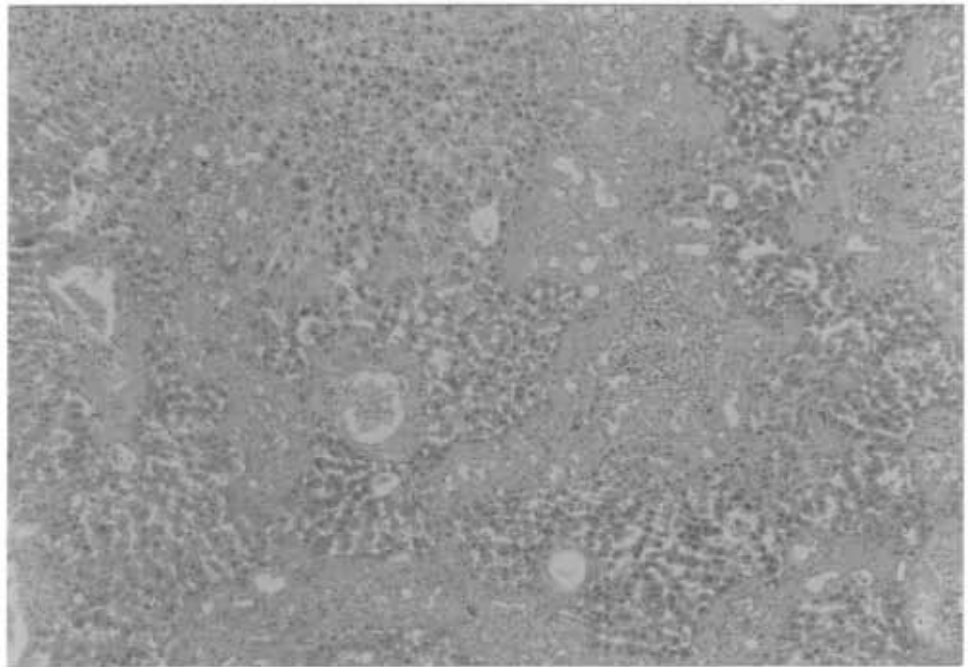


รูปที่ 16-17 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercaria หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ให้ DMN 1.3 ppm เป็นเวลา 5 สัปดาห์ และต่อมาให้แอลกอฮอล์ 10% เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (ขยาย 10 เท่า และ ขยาย 25 เท่า) พบ hyperplastic nodule ของเซลล์ตับ periportal fibrosis และ cholangiofibroma ขนาดใหญ่





รูปที่ 18-19 เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercaria และให้ DMN 1.3 ppm พร้อมกับ แอลกอฮอล์ 10% ในน้ำดื่มเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (ขยาย 10 เท่า และ ขยาย 25 เท่า) พบ cholangiofibroma และ cholangiofibrosis เป็นบริเวณกว้าง



ตารางที่ 2 summary of histopathologic findings

	control	DMN	EtOH	DMN+ EtOH	OV	OV+DMN	DMN+ EtOH	OV+DM N+EtOH
Lobular architecture								
Bridging fibrosis	-	-	-	-	+	++	+	++
Periportal fibrosis	-	-	-	-	++	++	++	++
Hepatic necrosis								
- Focal	-	++ *	-	++	-	++	-	++
- bridging	-	-	-	-	-	+++	-	++
Granuloma								
- Lipogranuloma	-	-	++	++	-	-	++	+++
- Ov egg granuloma	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
Amyloidosis	-	-	-	-	-	++	±	±
Liver parenchyma								
Fatty change								
- Small vacuole	-	+	++++	+++	-	+	+++	+++
- Large vacuole	-	++ **	-	+	-	++ **	-	++
Hyperplastic nodule	-	-	-	-	-	++	±	++
Bile duct (1st, 2nd, orders)								
Enlargement	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++
Periductal fibrosis	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
Periductal inflammation	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Epithelial hyperplasia and mucous metaplasia and papillary infolding	-	-	++	-	++	+++	+++	+++
	-	-	-	-	+	++	+++	++
	-	-	-	-	+	++	++	+++
Intrahepatic bile duct								
Ductular proliferation	-	-	-	-	++	+++	+++	++++
Glandular lesions	-	-	-	-	+	+	+	++
Cystic lesions	-	-	-	-	+	++	+	++
Cholangitis	-	-	-	-	+	++	+++	+++
Cholangiofibrosis	-	-	-	-	++	++	+++	+++
Cystic Cholangioma	-	+	-	+	-	++	+	+++

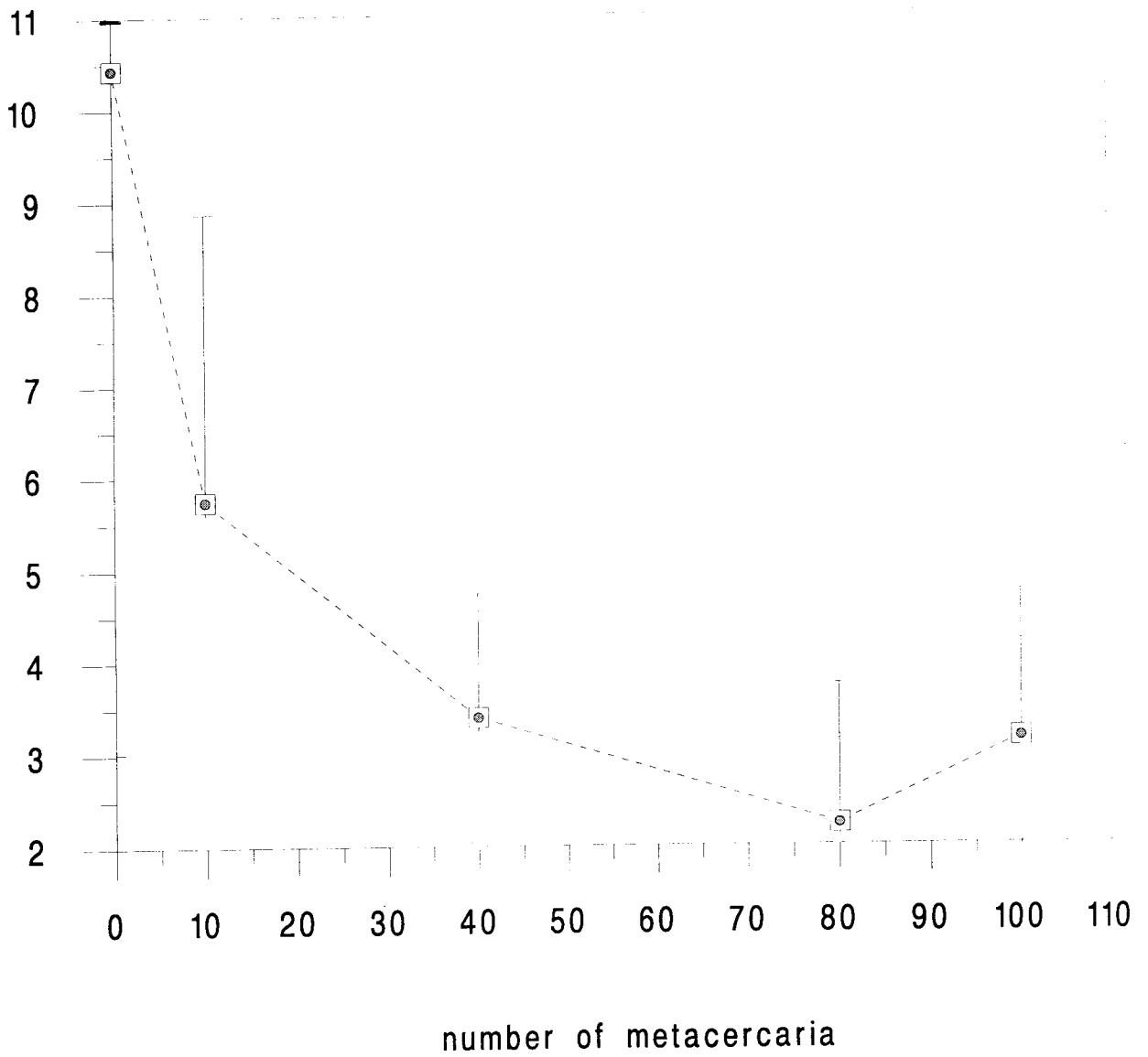
* พบใกล้ large portal vein เป็น acidophilic necrosis รอบๆ

** พบรอบ ๆ 1st order bile duct

+ = พบว่ามีลักษณะดังกล่าวและ จำนวน + มากแสดงว่ามีมากกว่า.

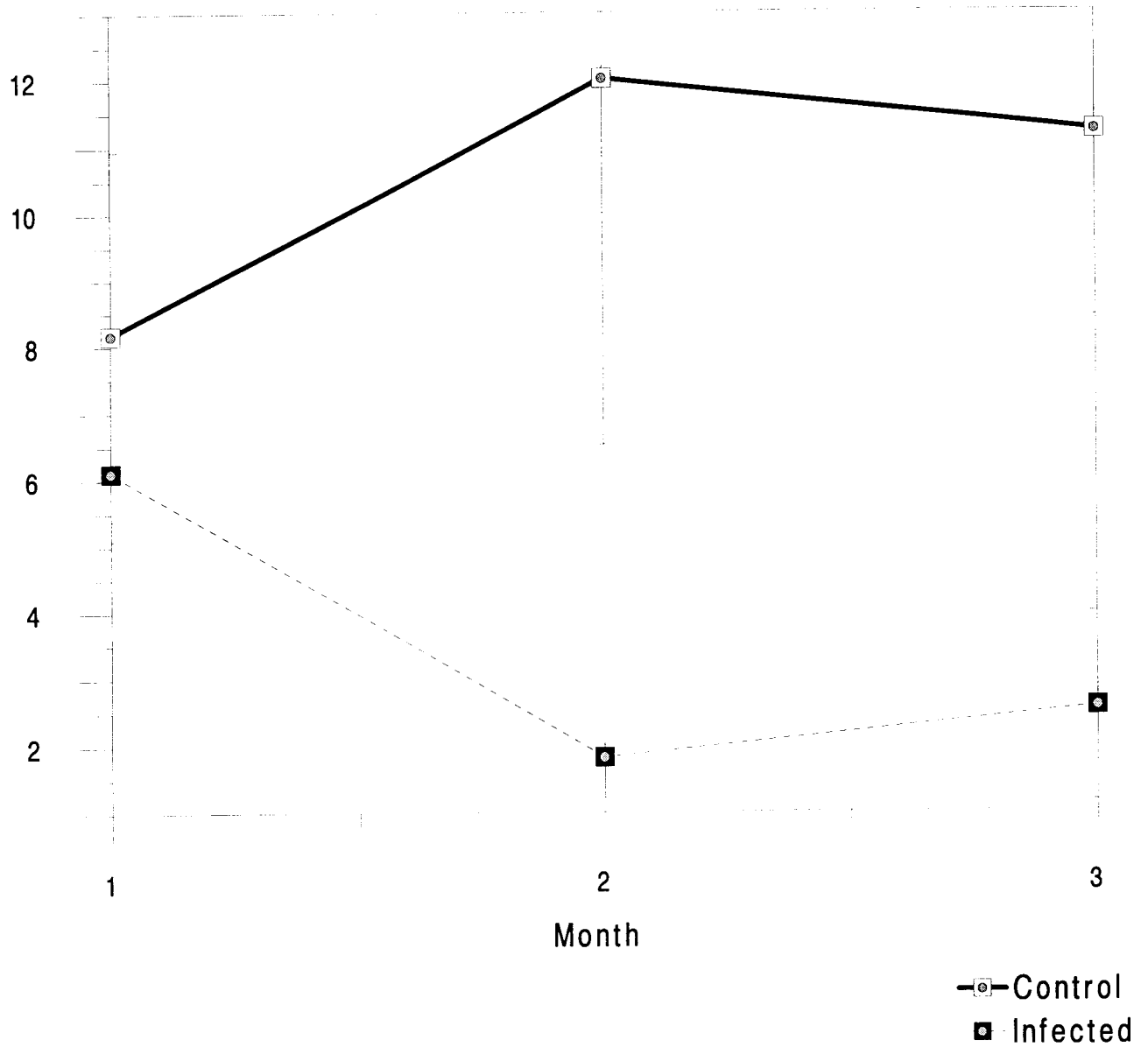
- = ไม่พบว่ามีลักษณะดังกล่าว

LPP (mcg/mg)



รูปที่ 20 ค่า lipid peroxidation products ของตับหนูแฮมสเตอร์ ที่ได้รับพยาธิ
ใบไม้ในดับ 10,40,80 และ 100 metacercaria

LPP (mcg/ml)



รูปที่ 21 เปรียบเทียบ lipid peroxidation products ในตับหนูแฮมสเตอร์
ภายหลังจากได้รับพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercaria เป็นเวลา
1, 2, 3, เดือนกับกลุ่มควบคุม

Discussion

การศึกษาผลของพยาธิใบไม้ตับ สารก่อมะเร็ง dimethylnitrosamine และแอลกอฮอล์ต่อการเกิดพยาธิสภาพของตับหนูแฮมสเตอร์ โดยการเปรียบเทียบลักษณะเนื้อเยื่อของตับที่ได้รับปัจจัยเหล่านี้ทำให้ได้ข้อมูลที่มีความสำคัญในการช่วยอธิบายกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในคนมากขึ้นเพิ่มจากที่วิทยาและคณะ (8,17) ได้เคยศึกษาโดยใช้หนูแฮมสเตอร์เป็นรูปแบบจำลองการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการให้พยาธิใบไม้ตับและสารก่อมะเร็ง DMN

ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการให้พยาธิใบไม้ตับ สารก่อมะเร็ง DMN, แอลกอฮอล์ หรือให้ร่วมกัน มีผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของหนูแฮมสเตอร์ ทั้งในแง่น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักตับ การกินอาหาร และน้ำของหนูแฮมสเตอร์ และทำให้ตับมีพยาธิสภาพแตกต่างจากตับหนูแฮมสเตอร์ปกติอย่างชัดเจน

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้ลดขนาดของ DMN ลงเป็น 1.3 ppm เพราะขนาด 6.5 ppm ทำให้หนูแฮมสเตอร์ตายก่อนสิ้นสุดการทดลอง ระดับการทำลายตับจึงน้อยกว่าที่วิทยาและคณะ (8,17) เคยศึกษาไว้ ซึ่งเป็นข้อดีที่ทำให้สามารถศึกษาผลการทำลายตับเพิ่มขึ้น จากแอลกอฮอล์ได้ ผลการทดลองที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่า การให้ DMN เพียงอย่างเดียว ทำให้เกิด focal hepatic necrosis เนื้อตับมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดเป็น vesicle, vacuole และ intrahepatic bile duct มี cystic cholangioma ได้บ้างแล้ว ส่วนการให้ แอลกอฮอล์พบว่าตับมี lipogranuloma และพบมากขึ้นเมื่อให้ทั้งพยาธิใบไม้ตับและ DMN การให้ แอลกอฮอล์มีผลให้เกิด fatty change อย่างชัดเจน การให้ทั้งพยาธิใบไม้ตับ พบว่า bile duct มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในด้านการเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น เกิด fibrosis และการอักเสบรอบๆ duct เกิด epithelial hyperplasia นอกจากนี้ intrahepatic bile duct ยังเกิด proliferation มี glandular และ cystic lesions เกิด cholangitis และ cholangiofibrosis เมื่อให้ DMN ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ หรือ แอลกอฮอล์ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ หรือ DMN และแอลกอฮอล์ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ พบว่าพยาธิสภาพเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น และรุนแรงที่สุดในกลุ่มที่ได้รับทั้งพยาธิใบไม้ตับ DMN และแอลกอฮอล์ โดยกลุ่มนี้ยังพบ cystic cholangioma เพิ่มมากกว่าการให้ DMN อย่างเดียว

การศึกษาระดับของ lipid peroxidation product (LPP) ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ และพบว่า LPP ลดลงตามจำนวน metacercaria และตามระยะเวลาที่ให้พยาธิใบไม้ตบนั้น แสดงให้เห็นว่าพยาธิใบไม้ตับเข้าไปรบกวนกระบวนการเมตาโบลิสมของตับและขนาด 100 metacercaria เป็นขนาดที่เหมาะสมสำหรับศึกษาผลที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อตับในระยะยาว ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง สารก่อมะเร็ง แอลกอฮอล์ และพยาธิใบไม้ตับในแง่ผลกระทบต่อเมตาโบลิสมของตับอย่างไรนั้นควรได้ศึกษาต่อไป ซึ่งการศึกษาในรายละเอียดของค่าทางชีวเคมีต่างๆ อาจทำให้เข้าใจกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ดีขึ้น ดังนั้นผลจากการศึกษาครั้งนี้ ชี้แนะว่าการใช้หนูแฮมสเตอร์เป็นรูปแบบจำลองการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในคน เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีส่วนร่วมในการเกิดมะเร็ง การให้สารก่อมะเร็ง dimethylnitrosamine ซึ่งเป็น initiator ในขนาดต่ำกว่าที่ทำให้เป็นมะเร็งเมื่อให้ร่วมกับ promoters คือพยาธิใบไม้ตับ และ แอลกอฮอล์ มีผลให้พยาธิสภาพรุนแรงขึ้นเป็นลำดับเนื่องจากทั้งพยาธิใบไม้ตับ และแอลกอฮอล์ ทำให้การอักเสบเกิดมากขึ้น ดังนั้นการได้รับสารก่อมะเร็งร่วมกับการได้รับพยาธิใบไม้ตับ และแอลกอฮอล์ก็อาจทำให้เป็นมะเร็งได้เร็ว และรุนแรงขึ้นได้