

บทที่ 4

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาลักษณะของเซลล์ประสาทในชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex ตามทฤษฎีวิวัฒนาการซึ่งแบ่งสมองเป็นยุคต่าง ๆ นั้น entorhinal cortex ได้รับการจำแนกว่าเป็นสมองที่ไม่มีพัฒนาการเทียบเท่าสมองส่วน neocortex (isocortex) โดย Vogt and Vogt (1919) จัดว่าเป็นส่วนหนึ่งของ allocortex ส่วน Rose (1927) จัดเป็นส่วนหนึ่งของ mesocortex สำหรับ Ariens Kappers (1909) จัด entorhinal cortex เป็น paleocortex และ Brodmann (1909) จัดอยู่ในกลุ่มของ heterogenetic cortex แนวคิดในการแบ่ง cortex เป็นยุคต่าง ๆ นั้นถือตามความสามารถในการพัฒนาจำนวนชั้นที่ปรากฏอยู่ใน cortex เป็นสำคัญ โดยหาก cortex ใดแสดงลักษณะชั้นของเซลล์ประสาท (cytoarchitecture) ภายในเป็น 6 ชั้นตั้งแต่เริ่มต้น ก็ถือว่าเป็นส่วนที่มีพัฒนาการสูงสุด เรียกว่า neocortex ปัจจุบันมีผู้ศึกษาเป็นจำนวนมากที่พยายามศึกษาการแบ่งชั้นของเซลล์ประสาท โดยอาศัยวิธีการต่าง ๆ มากไปกว่าการอาศัยลักษณะของเซลล์ประสาทเพียงอย่างเดียว เช่น อาศัยคุณสมบัติในการติดต่อเชื่อมโยงกับสมองส่วนอื่นบริเวณเดียวกัน เพื่อแสดงให้เห็นว่าสมองส่วนที่ไม่ได้รับการจำแนกว่าเป็น neocortex นั้น แท้จริงแล้วในแต่ละชั้นมีเซลล์ที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเซลล์ในแต่ละชั้นของ neocortex (Ebbeson, 1980; Swanson, 1983) ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่า entorhinal cortex มีเซลล์ประสาทที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับเซลล์ในชั้นที่ 5 ของ neocortex (Jones, 1984; Sripanidkulchai and Wyss, 1987) หรือไม่ แต่เนื่องจากปัญหาในการระบุชั้นของ entorhinal cortex มีความแตกต่างกันในผู้ศึกษาแต่ละคน (Amaral *et al.*, 1987) ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแบ่งชั้นภายในของสมองบริเวณนี้ก่อน โดยในการศึกษาเกี่ยวกับการแบ่งชั้นครั้งนี้ ได้ใช้วิธีย้อมเนื้อเยื่อสมองเพื่อแสดงลักษณะรูปร่าง ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ประสาทด้วย methylene blue ซึ่งสามารถแสดงลักษณะของเซลล์ประสาทในชั้นได้ แต่วิธีการศึกษาแบบนี้ไม่สามารถระบุขอบเขตของแต่ละชั้นได้ชัดเจนดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการศึกษาอย่างอื่นประกอบ ในที่นี้ได้เลือกใช้วิธีการย้อมเนื้อเยื่อเพื่อหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนร่วมด้วย ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถระบุขอบเขตของสมองแต่ละชั้นได้เป็นอย่างดี (Storm-Mathisen and Blackstad, 1964; Sripanidkulchai and Wyss, 1986 b) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการศึกษานี้ไม่สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ประสาทได้ เมื่อใช้วิธีการศึกษาทั้งสองวิธีร่วมกันสามารถแก้ปัญหาซึ่งเป็นจุดด้อยของแต่ละวิธีได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำเนื้อเยื่อสมองชิ้นเดียวกันมาศึกษาด้วยวิธีการย้อมร่วมกันทั้งสองวิธี (double stain) จะแสดงให้เห็นลักษณะของเซลล์ประสาทในชั้นและขอบเขตของชั้นอย่างชัดเจน หลังจากที่ได้ศึกษาการแบ่งชั้นของ entorhinal cortex แล้ว จึงได้ทดลองเพื่อยืนยันลักษณะและตำแหน่งของเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ทั้งนี้โดยอาศัยสมมติฐานจากคุณสมบัติของเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ neocortex (Jones, 1984) และคุณสมบัติของเซลล์ประสาทที่พบในชั้นที่

5 ของ retrosplenial cortex (Sripanidkulchai and Wyss, 1987) คือ เซลล์ประสาทในชั้นนี้จะส่งเส้นใยประสาทออกไปสิ้นสุดที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งซึ่งเป็น subcortical structures (corticosubcortical neurons) ในการพิสูจน์นี้ได้ศึกษาโดยการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทตรงบริเวณที่คาดว่าปลายเส้นประสาทในชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex สิ้นสุดลง ซึ่งการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทนี้เป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อแสดงตำแหน่งของเซลล์ประสาทต้นกำเนิดได้อย่างชัดเจน แต่ในการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทนั้นมีปัญหาในการระบุตำแหน่งที่สิ้นสุดของปลายประสาท เพราะสารเรืองแสงสามารถซึมซับเข้าเส้นใยประสาทที่มีรอยฉีกขาดหรือถูกกระทบกระเทือนได้ตลอดความยาวของมัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการฉีดสารเรืองแสงไล่ตำแหน่งไปจนกว่าเซลล์ประสาทนั้นจะไม่แสดงลักษณะเรืองแสง หรืออีกนัยหนึ่งคือ เป็นตำแหน่งสุดท้ายที่เมื่อฉีดสารเรืองแสงแล้วเซลล์ประสาทตัวนั้นยังคงแสดงลักษณะเรืองแสงอยู่ ก็จะถือว่าเป็นตำแหน่งสิ้นสุดของใยประสาท สำหรับคุณสมบัติของสารเรืองแสงที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษา ต้องพิจารณาหลายประการ ได้แก่ ความสามารถในการที่ถูกซึมซับได้ง่ายเมื่อใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย (20-40 นาโนลิตร) เพื่อจำกัดขอบเขตของตำแหน่งที่ฉีด (confined injection site) ความคงทนของสารเรืองแสงในเนื้อเยื่อ ซึ่งต้องผ่านกรรมวิธีหลายขั้นตอนนี้ก่อนในระหว่างการเตรียมเป็นต้นจากการพิจารณาคุณสมบัติ ดังกล่าวในการทดลองครั้งนี้จึงได้เลือกใช้สารเรืองแสง 2 ชนิด คือ Fast blue (4% Fast blue in water : FB) และ Fluoro-Gold (4% Fluoro-Gold in water : FG) ซึ่งจากผลการศึกษาของ Sripanidkulchai and Wyss (1986 b) พบว่า สารเรืองแสงทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการศึกษาหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Fast blue สามารถใช้ในปริมาณที่น้อย ซึมซับเข้าปลายประสาทได้รวดเร็ว มีคุณสมบัติของการเรืองแสงที่ดีและสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดและความร้อนในระหว่างการเตรียมเนื้อเยื่อ ตลอดจนสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน สำหรับ Fluoro-Gold มีคุณสมบัติที่ดีเช่นเดียวกับ Fast blue แต่เมื่อใช้ในปริมาณเท่ากันจะมีการกระจายของสารตรงตำแหน่งที่ฉีดสารมากกว่า ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการฉีดสารเรืองแสง Fluoro-Gold ในปริมาณที่น้อยกว่า Fast blue

ผลการทดลองด้วยวิธีการทั้งสามในการศึกษาครั้งนี้ ได้แสดงให้เห็นว่า entorhinal cortex มีเซลล์ประสาทที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง subcortical structures จริง และจากการทดลองฉีดสารเรืองแสงเข้า subcortical structures ต่างๆ ในที่สุดพบว่าเมื่อฉีด Fluoro-Gold หรือ Fast blue เข้าบริเวณ nucleus accumbens ได้แสดงให้เห็นถึงเซลล์ประสาทต้นกำเนิดใน entorhinal cortex อย่างชัดเจน โดยเซลล์ประสาทที่เรืองแสงน้อยอยู่ในชั้นที่ติดสลิซซ์ที่สุดจากการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีน ซึ่งเป็นชั้นที่มีเซลล์รูปร่างปรางมีขนาดใหญ่มาก จากผลการทดลองในครั้งนี้ได้อธิบายว่าเป็นชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex แต่การศึกษาด้วยการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนใน entorhinal cortex โดยผู้ศึกษาค้นอื่น พบว่าชั้นที่ติดสลิซซ์และมีเซลล์ประสาทเรืองแสงดังกล่าวเป็นชั้นที่ 4 (layer IV) (Storm-Mathisen and Blackstad, 1964; Geneser-Jensen and Blackstad, 1971; Bakst and Amaral, 1984; Geneser, 1986; Slomianka and Geneser, 1991) ซึ่งสาเหตุของการระบุชั้นแตกต่างจากผลการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากผู้ศึกษาค้นอื่นยึดแนวการแบ่งชั้นของสมองส่วนนี้ตามการ

ศึกษาของ Lorente de No' (1933) ซึ่งระบุว่าชั้นนี้เป็นชั้นที่ 4 (layer of deep pyramid) นอกจากนี้ยังได้รับอิทธิพลแนวคิดในการแบ่งสมองเป็นส่วนต่างๆตาม comparative neurology ไม่ว่าจะเป็นทฤษฎี tectogenetic fundamental of six layers ของ Brodmann ซึ่งจัดว่า entorhinal cortex เป็นส่วนหนึ่งของ heterogenetic cortex แนวคิดในการแบ่งสมองเป็นยุคต่างๆของ Ariens Kapper (1909) ซึ่งจัดให้ entorhinal cortex เป็นสมองในยุค paleocortex และผลการศึกษาของ Vogt and Vogt (1919) ซึ่งจัดว่า entorhinal cortex เป็น allocortex ซึ่งแนวคิดเหล่านี้ระบุว่า entorhinal cortex เป็นส่วนหนึ่งของสมองที่มีเซลล์ประสาทที่จัดเรียงตัวเป็นชั้นภายในที่แตกต่างไปจาก neocortex ดังนั้นจึงทำให้ผู้ศึกษาภายหลังยึดถือเป็นหลักการมาโดยตลอด อย่างไรก็ตามแนวคิดในการแบ่งสมองเป็นส่วนต่างๆหรือยุคต่างๆตาม comparative neurology นั้นอยู่บนพื้นฐานการศึกษาทางด้าน cytoarchitectonic ซึ่งศึกษาการแบ่งชั้นโดยดูจากลักษณะของเซลล์ประสาท ขนาด และรูปร่างของ เซลล์ประสาท ตลอดจนการเกาะกลุ่มรวมกันเป็นชั้นของเซลล์ประสาทเป็นสำคัญ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในการแบ่งชั้นภายในสมองส่วนใดส่วนหนึ่งไม่อาจทำให้สมบูรณ์ได้ด้วยวิธีการศึกษาเพียงวิธีเดียว ดังนั้นเพื่ออธิบายให้เห็นความแตกต่างในการระบุชั้น จึงต้องศึกษาผลการทดลองของผู้ศึกษาคนอื่นเป็นเบื้องต้นก่อน คือ

ผลการศึกษาการแบ่งชั้นภายในสมองส่วน entorhinal cortex โดยวิธีการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนเพียงอย่างเดียวในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ พบว่าลักษณะของการติดสีภายในชั้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ในสัตว์ทดลองแต่ละชนิดมีทั้งความแตกต่างกันและคล้ายคลึงกัน โดยส่วนใหญ่ที่แตกต่างกันคือ ลักษณะการติดสีภายในชั้น supragranular (layer I-III) ส่วนที่คล้ายคลึงกันคือ ชั้น infragranular (layer IV-VI) ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ผลของปฏิกิริยาในการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีน สามารถแบ่ง entorhinal cortex เป็นสองส่วนชัดเจน คือ ส่วน dorsomedial (medial entorhinal cortex, MEC) และส่วน ventrolateral (lateral entorhinal cortex, LEC) (Slomianka and Geneser, 1991)

ในส่วน supragranular ที่แตกต่างกันนั้น พบว่าชั้นที่ 1 ของ entorhinal cortex ในหนูขาว ติดสีปานกลาง (moderated staining) (Stormmathisen and Blackstad, 1964) ส่วนในหนูตะเภา พบว่าชั้นที่ 1 สามารถจำแนกตามการติดสีได้เป็นสองชั้นย่อยๆ คือ ทางด้าน MEC พบว่า 2/3 ด้านนอกติดสีเข้มกว่า และ 1/3 ภายในติดสีจางกว่า (Geneser-Jensen and Blackstad, 1971) ซึ่งลักษณะเช่นเดียวกันนี้พบในกระต่าย (Geneser, 1986) และในหนูเล็ก (Slomiaka and Geneser, 1991) ส่วนชั้นที่ 1 ของ LEC นั้น พบว่า 1/3 ด้านนอกติดสีเข้มกว่า และ 2/3 ด้านในติดสีจางกว่า ความแตกต่างในการติดสีของชั้นที่ 2 ของสัตว์ทดลองแต่ละชนิดนั้น พบว่าใน entorhinal cortex ของหนูตะเภาชั้นที่ 2 ซึ่งเป็นชั้นของเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายดาว (stellate cell) มีขนาดใหญ่ติดสีเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์น้อยมาก (Geneser-Jensen and Blackstad, 1971) ส่วนในหนูขาว กระต่าย และหนูเล็ก พบว่าชั้นที่ 2 ติดสีเข้มปานกลาง (Slomianka and Blackstad, 1991) และเป็นการติดสีเฉพาะในส่วน neuropil เท่านั้น ส่วนเซลล์ในชั้นนี้ไม่ติดสีเลย ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบในชั้นที่ 2

ของลิง (Girgis, 1972; Bakst and Amaral, 1984) รวมทั้งพบในชั้นที่ 2 ของมนุษย์ (Green and Mesulam, 1988) สำหรับความแตกต่างระหว่างชั้นที่ 2 ของ MEC และ LEC นั้น พบว่าชั้นที่ 2 ของ LEC ติดสีเข้มกว่าเล็กน้อย แต่ที่สำคัญคือ ชั้นที่ 2 ของ LEC กว้างกว่าชั้นที่ 2 ของ MEC ในชั้นที่ 3 ซึ่งถือว่าเป็นชั้นที่มีลักษณะเด่นเป็นพิเศษในสมองส่วน entorhinal cortex นี้ พบว่าในหนูขาว หนูตะเภา กระต่าย และในหนูเล็ก ชั้นนี้ติดสีจางที่สุด หรือกล่าวได้ว่าเกือบไม่มีตะกอนสีจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เลย โดยเฉพาะส่วน MEC แต่สำหรับ LEC พบว่าติดสีในระดับปานกลาง (Slomiaka and Geneser, 1991)

เมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาการเกิดตะกอนสีในชั้น supragranular จากการศึกษาครั้งนี้กับผลการศึกษาของผู้ศึกษาคนอื่นตามที่กล่าวข้างต้น เห็นได้ว่าส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกัน คือ ชั้นที่ 1 ของ MEC ติดสีระดับปานกลาง ชั้นที่ 2 ติดสีจางกว่าชั้นที่ 1 เล็กน้อย และการติดสีในชั้นที่ 2 นั้น ในการทดลองครั้งนี้เป็นการติดสีที่เซลล์ประสาท ไม่ใช่ติดที่ neuropil อย่างที่พบในผลการศึกษาของ Storm-Mathisen and Blackstad (1964) ส่วนในชั้นที่ 3 นั้นมีลักษณะเช่นเดียวกัน คือ ติดสีจางที่สุดในส่วนของ MEC สำหรับทางด้าน LEC ของ entorhinal cortex นั้น พบว่าในการทดลองครั้งนี้ชั้นที่ 1 ติดสีจางซึ่งแตกต่างจากลักษณะที่พบว่า 1/3 ด้านนอกติดสีเข้ม และ 2/3 ด้านในติดสีจางตามผลการทดลองในหนูขาว หนูตะเภา กระต่าย และในหนูเล็ก ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับชั้นที่ 2 และชั้นที่ 3 ของ LEC ติดสีเข้มในระดับปานกลาง สอดคล้องกับผลการศึกษาของผู้ศึกษาคนอื่น แต่ในชั้นที่ 3 ของ LEC ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการติดสีทั้งเส้นใยประสาทและเซลล์ประสาท

ในชั้น infragranular พบว่าจากผลการศึกษาของผู้อื่นในสัตว์ทดลองชนิดต่าง ๆ มีลักษณะเหมือนกัน คือ ชั้นที่ 4 ติดสีเข้มมาก (darkly stain) ชั้นที่ 5 ติดสีจาง (slightly stain) และชั้นที่ 6 ติดสีเข้มปานกลาง (Storm-Mathisen and Blackstad, 1964; Geneser-Jensen and Blackstad, 1971; Bakst and Amaral, 1984; Geneser, 1986; Slomianka and Blackstad, 1991)

การศึกษานี้มีความแตกต่างกับผลการศึกษาของผู้อื่นข้างต้นตรงที่พบว่า การย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะซิติลโคลีนไม่สามารถแสดงให้เห็นลักษณะของชั้นที่ 4 ได้ และในบริเวณชั้นที่ผู้ศึกษาคนอื่นระบุว่าเป็นชั้นที่ 4 ซึ่งมีการติดสีเข้มมากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเป็นชั้นที่มีเซลล์ประสาทซึ่งมีคุณสมบัติส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens ตามผลการทดลองฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 เช่นเดียวกับที่พบใน neocortex (Jones, 1984; Sripanidkulchai, and Wyss, 1987)

การศึกษาโดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย methylene blue (Nissl stain) ในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นลักษณะของเซลล์ประสาทในแต่ละชั้นของ entorhinal cortex อย่างชัดเจน โดยกำหนดชั้นจากรูปร่าง ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในการรวมกันเป็นชั้น ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์ประสาทแต่ละชั้นมีความแตกต่างกันจริง ไม่ว่าจะเป็นรูปร่าง ขนาด และความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ในชั้น และเพื่อแสดงให้เห็นความแตกต่างดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำวิธีการวิเคราะห์

ข้อมูลจากภาพ (image analysis)¹ มาใช้ในการวัดค่าต่าง ๆ ซึ่งถือเป็นค่าพารามิเตอร์ (parameter) ของเซลล์ ได้แก่ พื้นที่ของเซลล์ เส้นรอบวงของเซลล์ เส้นผ่านกลาง และความหนาแน่นของเซลล์ (ดูตารางที่ 1) จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์ประสาทชั้นที่ 2 ของ LEC มีขนาดใหญ่สุดชั้นที่ 2 ของ MEC, ชั้นที่ 3 ของ LEC, ชั้นที่ 5 (MEC และ LEC) และชั้นที่ 6b (MEC และ LEC) มีขนาดปานกลางจนถึงใหญ่เกือบเท่าชั้นที่ 2 ของ LEC ส่วนชั้นที่ 3 ของ MEC มีขนาดเล็ก และพบว่าชั้นที่ 6a มีเซลล์ประสาทขนาดเล็กที่สุดใน entorhinal cortex (ดูตารางที่ 2) สำหรับความหนาแน่นต่อพื้นที่ของเซลล์ประสาทในแต่ละชั้นของ entorhinal cortex พบว่าเซลล์ประสาทในชั้นที่ 2 ของ LEC อยู่หนาแน่นมากกว่าชั้นอื่นๆ และเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 อยู่หนาแน่นน้อยที่สุด (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพในการศึกษาค้างนี้ไม่อาจวัดความลึกหรือความหนาของเซลล์ได้ เนื่องจากภาพที่ถ่ายจากสไลด์และปรากฏบนจอปรากฏเพียง 2 มิติเท่านั้น (กว้าง x ยาว) ดังนั้นเพื่อให้การวัดค่า พารามิเตอร์ของเซลล์ประสาทในชั้นต่างๆของ entorhinal cortex ได้ใกล้เคียงค่าเป็นจริงมากที่สุด ได้ยึดแนวปฏิบัติดังนี้

1. กำหนดคุณลักษณะของเซลล์ประสาทในแต่ละชั้นที่ถูกวัดว่า ต้องเป็นเซลล์ที่ปรากฏ nucleolus ใน nucleus อย่างชัดเจน เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีลักษณะจำเพาะร่วมกัน ซึ่งเพิ่มความถูกต้อง (validity) ตรงความเป็นจริงในการวัด โดยถ้าหากวัดทุกๆเซลล์ที่ปรากฏในกล้องจุลทรรศน์มีความคลาดเคลื่อนมาก เนื่องจากเซลล์บางเซลล์อาจปรากฏเพียงบางส่วน จากการตัดชิ้นเนื้อไม่ผ่าน nucleus ของเซลล์ ซึ่งมีผลให้เซลล์ที่ปรากฏอยู่นั้นมีขนาดเล็กกว่าความเป็นจริง

2. ค่าที่วัดได้แต่ละครั้งเป็นค่าคำนวณซึ่งสามารถปรับให้ได้ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด โดยการเพิ่มจำนวนครั้งของการวัด หรือพยายามวัดให้ครบทุกพื้นที่ภายในชั้น ซึ่งในการศึกษาค้างนี้ ได้วัดเซลล์ประสาทครบทุกพื้นที่ภายในชั้น แล้วนำค่าพารามิเตอร์ที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ซึ่งวิธีนี้เชื่อว่าจะได้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆของเซลล์ประสาทแต่ละชั้นใกล้เคียงค่าเป็นจริงมากที่สุด ดังปรากฏในตารางที่ 1

อีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจมาพิจารณาจากผลการศึกษาครั้งนี้ คือ การศึกษาการแบ่งชั้นภายในสมองส่วน entorhinal cortex โดยอาศัยวิธีการย้อมหาเออนโซมทำสลายอเซทิลโคลีนนั้นสอดคล้องหรือสนับสนุนการแบ่งชั้นด้วยวิธีการย้อมด้วย methylene blue หรือไม่ ทั้งนี้จากการศึกษาของ Ramon y Cajal (1901, 1903) และ Lorente de No' (1933) ซึ่งศึกษาลักษณะการจัดตัวเป็นชั้นของเซลล์ประสาทจากการย้อม Nissl ได้วางหลักการแบ่งชั้นต่างๆภายในสมองส่วนนี้อาไว้จนเป็นแบบฉบับในการระบุชั้นสำหรับผู้ศึกษาในภายหลัง แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของทั้งสองคนก็มีความแตกต่าง

¹ image analysis เป็นโปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพด้วยคอมพิวเตอร์ โดยคอมพิวเตอร์ทำหน้าที่แปลงข้อมูลจากภาพที่ถูกบันทึกไว้บนจอ(monitor) เป็นค่าพารามิเตอร์ของเซลล์ เช่น พื้นที่ เส้นรอบวง เส้นผ่านกลาง และอื่นๆตามความสามารถของโปรแกรม

ในการระบุชั้น โดย Ramon y Cajal แบ่ง entorhinal cortex เป็น 7 ชั้น ส่วน Lorente de No' แบ่งเป็น 6 ชั้น ซึ่งผู้ศึกษาในระยะต่อมา จะอ้างอิงการแบ่งชั้นตามแนวทางของใครคนหนึ่ง (Swanson, 1984; Amaral, Insausti and Cowman, 1987)

ผลงานการศึกษาของ Ramon y Cajal และ Lorente de No' ซึ่งมีความแตกต่างกันในการแบ่งชั้นนั้น สามารถเปรียบเทียบได้ดังนี้ ชั้นที่ 1 เป็นชั้น plexiform อยู่ริมนอกสุดของเนื้อเยื่อ ไม่มีเซลล์ประสาทเช่นกัน ชั้นที่ 2 ทั้ง Ramon y Cajal และ Lorente de No' จัดเป็นชั้น star cell เช่นกัน ส่วนชั้นที่ 3 นั้นทั้งสองคนมีความเห็นแตกต่างกัน คือ Lorente de No' ได้รวมเอาชั้นที่ 3 (layer of pyramidal cells) และชั้นที่ 4 (layer of deep plexiform) ของ Ramon y Cajal ไว้เป็นชั้นเดียวกัน และเรียกว่าเป็นชั้น superficial pyramid ส่วนชั้นที่ 4 ของ Lorente de No' (layer of deep pyramid) ตรงกับชั้นที่ 5 ของ Ramon y Cajal (layer of horizontal spindle cells) สำหรับชั้นที่ 5 ของ Lorente de No' (layer of small pyramid with recurrent axis cylinder) ตรงกับชั้นที่ 6 ของ Ramon y Cajal และเรียกชื่อชั้นเหมือนกัน และชั้นที่ 6 ของ Lorente de No' เป็นชั้นสุดท้าย (layer of polymorph cell) ตรงกับชั้นที่ 7 ของ Ramon y Cajal (layer of polymorph cell and spindle cell) อย่างไรก็ตาม แม้ว่า Lorente de No' แบ่ง entorhinal cortex เป็น 6 ชั้นก็จริง แต่พบว่าในชั้นที่ 3 และชั้นที่ 6 นั้น เขาแบ่งแต่ละชั้นเป็นชั้นย่อยได้อีก คือ แบ่งเป็นชั้นที่อยู่ติดต่อชั้นที่ 3 เป็นชั้น 3a ซึ่งตรงกับชั้นที่ 4 ของ Ramon y Cajal ส่วนชั้นที่ 6 นั้นแบ่งชั้น 6a (polymorph cell) และชั้น 6b (spindle cell)

จากการวิเคราะห์ผลการศึกษาของทั้งสองคน จะเห็นว่าความแตกต่างที่สำคัญในการระบุชั้นภายใน entorhinal cortex อยู่ที่การจำแนกเซลล์ประสาทชั้นที่ 3 โดย Lorente de No' รวมเอาชั้นที่ 4 ของ Ramon y Cajal ไว้ด้วย จึงทำให้ลำดับของชั้นในส่วนลึกต่อไปคลาดเคลื่อนกัน ทั้งนี้โดย Lorente de No' พบว่าในส่วนที่เป็นชั้นที่ 4 ของ Ramon y Cajal (deep plexiform layer) นั้นส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเส้นใยประสาท (plexuses of basal dendrite) ของเซลล์ประสาทในชั้นที่ 3 จึงจำแนกชั้นนี้ว่าเป็นชั้น 3a (IIIa) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง Ramon y Cajal และ Lorente de No' พบว่าในชั้นนี้นอกจากมีกลุ่มเส้นใยประสาทดังกล่าวแล้ว ยังพบปลายเส้นใยประสาทจากส่วนอื่นมาสิ้นสุดด้วย ซึ่งในระยะนั้นไม่สามารถระบุแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นใยประสาทเหล่านี้ได้ แต่เชื่อว่าน่าจะผ่านมากับ white matter ทั้งสองคนได้เสนอให้มีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นนี้

ดังนั้นจึงเห็นได้อย่างชัดเจนว่า สาเหตุที่ทำให้การแบ่งชั้นภายใน entorhinal cortex ของ Ramon y Cajal (1903) และ Lorente de No' (1933) แตกต่างกันอยู่ตรงชั้นของกลุ่มเส้นใยประสาทที่อยู่ติดต่อชั้นที่ 3 นั้นเอง ซึ่งจากการย้อมด้วย methylene blue ในการศึกษาครั้งนี้เป็นบริเวณแถบว่างแคบอยู่ติดต่อเซลล์รูปร่างปิรามิดที่มีขนาดเล็ก ซึ่งได้รับการจำแนกว่าเป็นชั้นที่ 3 และตรงกับบริเวณ lamina dissecans (Rose, 1927; Sgonina, 1938; Braak, 1972)

ต่อประเด็นที่เป็นข้อสงสัยว่าการแบ่งชั้นโดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย methylene blue ดังกล่าว สอดคล้องกับการแบ่งโดยการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนหรือไม่ พบว่าจากผลการศึกษาครั้งนี้ในชั้นที่ 1 และชั้นที่ 2 มีความสอดคล้องกันทั้งสองวิธี และสิ่งที่พบอย่างชัดเจนคือความแตกต่าง

ของชั้นที่ 1 และชั้นที่ 2 ของ MEC และ LEC โดยวิธีการศึกษาทั้ง 2 วิธี สามารถแยกความแตกต่างของบริเวณทั้งสองอย่างชัดเจน (รายละเอียดตามผลการศึกษา) ส่วนชั้นที่ 3 นั้นจากการย้อมหาเออนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนนี้ พบว่าในส่วนของ MEC และ LEC ครอบคลุมบริเวณ lamina dissecans ดังกล่าวด้วยเหมือนกัน และดูเหมือนว่าเป็นชั้นที่ 3 ทั้งหมด นั้นหมายความว่าชั้นที่ 3 จากการย้อมหาเออนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนดังกล่าวรวมเอาชั้น 3a ของ Lorente de No' หรือชั้นที่ 4 ของ Ramon y Cajal ไว้เป็นชั้นเดียวกัน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของคนอื่นๆ (Storm-Mathisen and Blackstad, 1964; Geneser-Jensen and Blackstad, 1971) อย่างไรก็ตามจากการสังเกตของ Geneser (1986) พบว่าในส่วนที่ติดสีจางของชั้นที่ 3 ของ MEC นั้น ส่วนลึกสุดของชั้นนี้ติดสีจางกว่าส่วนบน ซึ่งประเด็นนี้สมควรที่จะศึกษาต่อไปว่าส่วนลึกสุดของชั้นที่ 3 นี้เป็นส่วนหนึ่งของชั้นที่ 3 จริงหรือไม่ ยิ่งเมื่อพบว่าผลการศึกษาของ Ramon y Cajal และ Lorente de No' ที่ไม่สามารถระบุแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดเส้นใยประสาทที่มาสิ้นสุดที่บริเวณนี้ ยังเป็นประเด็นที่จะต้องได้รับการพิสูจน์ต่อไป

ในชั้นที่ติดต่อชั้นที่ 3 นั้น จากผลการศึกษาการแบ่งชั้นภายในของสมองส่วน entorhinal cortex ด้วยการย้อมหาเออนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนทั้งหมด ตั้งแต่ Storm Mathisen และ Blackstad (1964) จนถึงผลการศึกษาสุดท้ายของ Slomianka and Geneser (1991) จำแนกว่าเป็นชั้นที่ 4 ซึ่งพบว่าการย้อมหาเออนไซม์ในชั้นนี้ติดสีเข้มมากที่สุด สำหรับการศึกษานี้ครั้งนี้ระบุว่าชั้นนี้เป็นชั้นที่ 5 ทั้งนี้โดยมีเหตุผลสนับสนุนคือ 1) ชั้นนี้มีเซลล์ประสาทที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens ซึ่งเป็น subcortical structures และลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับคุณสมบัติของเซลล์ประสาทในชั้นที่ 5 ของ neocortex (Jones, 1984; Sripanidkulchai and Wyss, 1986a, 1987) 2) เซลล์ในชั้นนี้เป็นเซลล์รูปปริมาตร มีขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 คล้ายคลึงกับที่พบใน neocortex โดยทั่วไป 3) โดยทั่วไปลักษณะของเซลล์ประสาทชั้นที่ 4 เป็นเซลล์ประสาทชนิด granules cells มีขนาดเล็ก (internal granular cells) ทำหน้าที่ติดต่อเชื่อมโยงระยะใกล้ภายในบริเวณเดียวกันของสมอง (intrinsic connection) ซึ่งลักษณะของเซลล์นี้ไม่พบในสมองส่วน entorhinal cortex (Brodmann, 1909) และในการศึกษานี้ก็ไม่พบเช่นกัน 4) ในชั้นที่ 4 ของ retrosplenial cortex ซึ่งจัดว่าเป็นสมองในยุค paleocortex เช่นเดียวกับ entorhinal cortex เป็นชั้นที่มีปลายประสาทจาก thalamus มาสิ้นสุด ทั้งนี้สามารถแสดงให้เห็นโดยวิธี anterograde autoradiography (Sripanidkulchai and Wyss, 1986a) อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษานี้มีข้อจำกัดไม่สามารถศึกษาโดยวิธีดังกล่าวประกอบด้วย จึงไม่สามารถแสดงชั้นที่ 4 ของ entorhinal cortex ให้เห็นได้ และ 5) จากผลการศึกษาของ Geneser (1986) พบว่าในส่วนลึกของชั้นที่ 3 ติดสีจากการย้อมหาเออนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีนจางกว่าส่วนบน ซึ่ง Ramon y Cajal (1903) และ Lorente de No' (1933) ก็พบว่ามีเส้นใยประสาทที่ยังไม่ทราบเซลล์ต้นกำเนิดมาสิ้นสุดลงด้วย ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าในชั้นที่เป็นส่วนลึกของชั้นที่ 3 นี้ อาจเป็นชั้นที่ 4 (layer IV) จริง หรือถ้าหาก

ไม่แบ่งเป็นชั้นชัดเจนก็อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ประสาทในชั้นนี้อยู่ในลักษณะกระจายแทรกอยู่ในชั้นที่ 3

จากเหตุผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า ในชั้นที่ติดสีเข้ม จากการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีน และอยู่ใต้ต่อชั้นที่ 3 นี้ ไม่มีคุณสมบัติของเซลล์ประสาทชั้นที่ 4 เลย แต่กลับมีคุณสมบัติส่วนใหญ่เหมือนกับเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ neocortex ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าจึงระบุว่าเป็นชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex อย่างชัดเจน และนำไปสู่คำตอบในประเด็นการศึกษาที่ว่า แท้จริงแล้วชั้นที่ 4 ของ Lorente de No' ก็คือชั้นที่ 5 ของ neocortex (Jones, 1984) นั่นเอง อย่างไรก็ตามเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไปในอนาคต คือ ต้องศึกษาถึงลักษณะของเซลล์ชั้นที่ 4 ให้ชัดเจน โดยอาศัยแนวทางและหลักการดังที่กล่าวมาแล้ว

สำหรับชั้นที่ 6 จากการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะติดสีเข้มปานกลาง แต่ส่วนที่อยู่ติดกับ white matter ติดสีเข้มกว่าอย่างเห็นได้ชัด และจากการย้อมด้วย methylene blue พบว่าในส่วนที่ติดสีเข้มปานกลาง มีเซลล์ประสาทรูปร่างปิรามิดขนาดเล็กที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในชั้นอื่นๆ ของ entorhinal cortex (ดูตารางที่ 2) ในการศึกษาครั้งนี้เรียกว่า ชั้น 6a ส่วนชั้นที่เล็กกว่าเป็นชั้นของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเรียกว่า ชั้น 6b จากการศึกษาของ Sripanidkulchai (personal communication) พบว่าสำหรับชั้น 6a นั้นคาดว่าเป็นชั้นที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง thalamus (corticothalamic projecting neuron) ส่วนชั้น 6b นั้นเชื่อว่าเป็นชั้นของเซลล์ประสาทที่ติดต่อเชื่อมโยงกับสมองส่วนอื่นระยะใกล้

เมื่อเปรียบเทียบกับชั้นต่างๆ ของ Ramon y Cajal (1903) และ Lorente de No' (1933) โดยอาศัยลักษณะต่างๆ ของเซลล์ประสาท พบว่าชั้นที่ 6a ของการศึกษาค้นคว้านี้มีลักษณะใกล้เคียงกับชั้นที่ 6 ของ Ramon y Cajal และชั้นที่ 5 ของ Lorente de No' ส่วนชั้นที่ 6b มีลักษณะใกล้เคียงกับชั้นที่ 7 ของ Ramon y Cajal แต่ไม่เหมือนกับชั้นที่ 6 ของ Lorente de No' ทั้งนี้ Lorente de No' แบ่งชั้นนี้ออกเป็น 2 ชั้นย่อย คือ ชั้น 6a (polymorp cells) และชั้น 6b (spindle cells) นั่นคือ ชั้น 6a และ 6b ในผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากชั้น 6a และ 6b ของ Lorente de No' ซึ่งในประเด็นของความแตกต่างจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

จากผลการศึกษาครั้งนี้ที่ระบุว่าชั้นที่อยู่ใต้ต่อชั้นที่ 3 เป็นชั้นที่ติดสีเข้ม มีเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ และส่งเส้นใยประสาทไปสิ้นสุดที่ nucleus accumbens เป็นชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex นั้น แสดงให้เห็นว่าในการจำแนกชั้นต่างๆ ของสมองไม่อาจทำให้ถูกต้องทั้งหมดด้วยวิธีการศึกษาวิธีใดวิธีหนึ่งเพียงอย่างเดียว เหตุผลสำคัญที่ทำให้ผลการศึกษาในครั้งนี้ระบุว่าเป็นชั้นที่ 5 มาจากการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ประสาทชั้นนี้ เปรียบเทียบกับเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ neocortex ซึ่งใน neocortex นั้นพบว่าเซลล์แต่ละชั้นมีคุณสมบัติในการส่งเส้นใยประสาทออกไปบริเวณแตกต่างกัน และพบว่าเซลล์ประสาทที่ส่งเส้นใยประสาทออกไปนั้น ส่วนใหญ่เป็นเซลล์รูปร่างปิรามิด (Gilbert and Kelly, 1975; Lund et al., 1975; Jones and Wise, 1977; Catsman-Berrevoets and Kuypers, 1976) สำหรับแบบฉบับของการส่งเส้นใยประสาทออกไปนั้น Jones (1984) ได้แสดงให้เห็นว่า ชั้น

ที่ 1 ไม่มีเซลล์ประสาท ชั้นที่ 2 มีเซลล์ประสาทติดต่อเชื่อมโยงภายในสมองข้างเดียวกัน ชั้นที่ 3 มีเซลล์ประสาทติดต่อเชื่อมโยงระหว่างสมองสองซีก ชั้นที่ 4 มีเซลล์ประสาทติดต่อเชื่อมโยงภายในสมองบริเวณเดียวกันระยะใกล้ ชั้นที่ 5 มีเซลล์ประสาทสำหรับติดต่อกับบริเวณอื่นระยะไกลกว่า ส่วนชั้นที่ 6 มีเซลล์ประสาทติดต่อเชื่อมโยงกับ thalamus สำหรับชั้นที่ 4 นั้น Jones ระบุว่า เป็นชั้นที่มีปลายประสาทจาก thalamus มาติดต่อเชื่อมโยงด้วยอย่างใกล้ชิด (Jones, 1984; Jones and Burton, 1976 a) นอกจากนี้ Jones ยังเสนอว่าแบบฉบับเช่นนี้จะพบในทุกๆ ส่วนของสมอง

ในการทดลองเพื่อค้นหาเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex ในครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีฉีดสารเรืองแสงเข้าบริเวณปลายประสาทของเซลล์ในชั้นนี้ไปสิ้นสุด โดยได้ฉีดสารเรืองแสงสองชนิด คือ Fluoro-Gold และ Fast blue ในปริมาณที่น้อย (20-40 นาโนลิตร) เพื่อให้ได้ผลการทดลองถูกต้องอย่างไรก็ตามการหาตำแหน่งที่สิ้นสุดของปลายประสาทเป็นสิ่งที่ยุ่งยากพอสมควรเพราะปัญหาในการนี้พบว่ามิเซลล์ต้นกำเนิดเรืองแสงไม่ได้หมายความว่าตำแหน่งที่ฉีดสารเรืองแสงนั้นเป็นตำแหน่งสุดท้ายของปลายประสาทจริงๆ จนกว่าจะพิสูจน์ได้ว่าตำแหน่งนั้นเพียงตำแหน่งเดียวที่เมื่อฉีดสารเรืองแสงแล้วเซลล์ต้นกำเนิดยังคงเรืองแสงอยู่ ทั้งนี้เพราะสารเรืองแสงสามารถถูกดูดซับเข้าเส้นใยประสาทได้ ถ้าเส้นใยประสาทนั้นๆ ฉีกขาด หรือได้รับความกระทบกระเทือน ซึ่งถ้าหากเป็นกรณีเช่นนี้จะทำให้ไม่สามารถระบุว่าตำแหน่งที่ฉีดนั้นเป็นปลายประสาทที่แท้จริง แต่จากการฉีดสารเรืองแสงในปริมาณที่น้อย และฉีดเข้าบริเวณใกล้เคียงหลายๆตำแหน่งสามารถแก้ปัญหานี้ได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้เมื่อฉีดสารเรืองแสงเข้าบริเวณ nucleus accumbens จึงสามารถแสดงให้เห็นเซลล์ประสาทต้นกำเนิดในชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex อย่างชัดเจน สำหรับการแสดงให้เห็นเซลล์ประสาทต้นกำเนิดด้วยการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทที่ nucleus accumbens ในครั้งนี้แตกต่างจากผลการศึกษาของคนอื่น โดยผลการศึกษาของ Krayniak *et al.* (1981) ซึ่งศึกษาทั้งวิธีฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาท (horseradish peroxidase histochemistry tracing) และวิธีฉีดสารกัมมันตภาพรังสีเข้าตัวเซลล์ประสาท (autoradiography tracing of tritiated amino acid) ในหนูขาว พบว่าเซลล์ประสาทชั้นที่ 2 และ 3 ของ entorhinal cortex ส่งเส้นใยไปยัง nucleus accumbens ซึ่ง Groenewegen *et al.* (1982) ได้ศึกษาในหนูขาว เช่นเดียวกันแต่ใช้สารเรืองแสงชนิดอื่น (bisbenzimidazole, nuclear yellow, Fast blue) ฉีดเข้าปลายประสาทพบว่าเซลล์ในชั้นที่ 4 ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens ส่วน Sorensen (1985) ซึ่งใช้วิธีศึกษาทั้งวิธีฉีดสารกัมมันตภาพรังสีเข้าตัวเซลล์ และฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาท พบว่าเซลล์ประสาทจากชั้นที่ 5 และชั้นที่ 6 ส่งเส้นใยประสาทไปยัง striatum และ nucleus accumbens สำหรับ Swanson and Köhler (1986) ศึกษาโดยวิธีฉีดสารกัมมันตภาพรังสีเข้าตัวเซลล์ในหนูขาว พบว่าเซลล์ประสาทของ entorhinal cortex ชั้นที่ 4 ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens และส่วน medial caudoputamen ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Groenewegen *et al.* ดังที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาของ Kelly and Domesick (1982) ศึกษาในหนูขาวทั้งวิธีฉีดสารกัมมันตภาพรังสีเข้าตัวเซลล์ประสาทและฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทพบว่าเฉพาะเซลล์

ฉีดสารกัมมันตภาพรังสีเข้าตัวเซลล์ประสาทและฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทพบว่าเฉพาะเซลล์จาก hippocampal formation เท่านั้นที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens ส่วนบริเวณ entorhinal cortex ไม่พบว่ามีเซลล์ส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณดังกล่าวเลย ในการศึกษาของ Newman and Winans (1980) ทั้งโดยวิธีฉีดสารกัมมันตภาพรังสีและฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทเช่นเดียวกันกลับพบว่าเฉพาะ LEC เท่านั้นที่มีเซลล์ประสาทส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens โดยในรายงานการศึกษาของเขาได้แสดงการจัดตัวอย่างเป็นระเบียบในการติดต่อเชื่อมโยงของเซลล์ (topography) ที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens ดังกล่าว คือ เซลล์จากบริเวณส่วนหลังของ LEC (28L) ส่งเส้นใยประสาทไปยังส่วนหน้า (rostral part) และส่วนหลังด้านข้าง (caudo-lateral part) ของ nucleus accumbens ในขณะที่บริเวณส่วนหน้าของ LEC (28L') และบริเวณติดต่อระหว่าง MEC และ LEC (TR) ส่งเส้นใยประสาทไปยังส่วนหลังด้านใน (caudo-medial part) ของ nucleus accumbens เป็นที่น่าเสียดายที่ในผลการศึกษาของ Newman and Winans ไม่ได้ระบุชั้นของเซลล์ภายใน entorhinal cortex ที่ส่งเส้นใยประสาทออกไป

เหตุผลในการระบุชั้นที่เป็นที่อยู่ของเซลล์ประสาทต้นกำเนิดที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens แตกต่างกัน รวมทั้งแตกต่างจากผลการศึกษาครั้งนี้ เป็นประเด็นที่ต้องได้รับการอภิปรายอย่างกว้างขวาง เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามคาดว่าจะอาจมีสาเหตุจาก 1) การกำหนดชั้นแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยเฉพาะผลการศึกษาที่พบว่าเซลล์ประสาทต้นกำเนิดของเส้นใยประสาทที่ไปยัง nucleus accumbens อยู่ในชั้นที่ 4 (Groenewegen *et al.*, 1982; Swanson and Köhler, 1986) ถ้าหากผลการศึกษาเหล่านี้มีผลการทดลองถึงการแบ่งชั้นภายในสมองส่วน entorhinal ด้วยวิธีอื่นๆ ก็อาจเป็นไปได้ว่ามีโอกาสที่จะสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ 2) สำหรับผลการศึกษาที่พบว่าชั้นที่ 2 และ 3 ของ entorhinal cortex มีเซลล์ประสาทส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens (Krayniak, *et al.* 1981) นั้น อาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษาโดยฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทนั้นอาจฉีดลึกลงไปถึงบางส่วนของ olfactory tubercle จึงทำให้เห็นเซลล์ชั้นที่ 2 และชั้นที่ 3 ของ entorhinal cortex ซึ่งลักษณะเช่นนี้ในการศึกษาครั้งนี้ก็สังเกตเห็นได้เช่นเดียวกัน แต่เมื่อฉีดสารเรืองแสงในปริมาณที่น้อยและจำกัดให้อยู่เฉพาะบริเวณของ nucleus accumbens ก็พบว่าเซลล์ในชั้นที่ 5 เท่านั้นที่ปรากฏลักษณะเรืองแสง ยกเว้นเมื่อตัดเนื้อเยื่อไปทางด้านหน้าของ entorhinal cortex พบว่าส่วนหน้าของ LEC มีเซลล์ประสาทเรืองแสงจำนวนเล็กน้อยอยู่ในชั้นที่ 3 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์จำนวนนี้จริงๆ แล้วเป็นเซลล์ของชั้นที่ 5 แต่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากเซลล์ส่วนใหญ่ของชั้น

สำหรับผลการศึกษาของ Sorensen (1985) พบว่าเซลล์ประสาทที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens อยู่ในชั้นที่ 5 และชั้นที่ 6 ของ entorhinal cortex และพบเฉพาะในส่วนที่เรียกว่า ventral part เท่านั้น ซึ่ง Sorensen ไม่ได้ระบุว่า เป็น MEC หรือ LEC แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทางด้าน ventral part ของ entorhinal cortex ตรงกับตำแหน่งของ LEC ซึ่งถ้าหากเป็นเช่นนั้นผลการ

ศึกษาของ Sorensen ก็แตกต่างจากผลการศึกษาในครั้งใหม่ที่พบว่าเซลล์ประสาทจากชั้นที่ 5 ทั้งของ MEC และ LEC ส่งเส้นใยประสาทไปยัง nucleus accumbens แต่คนละตำแหน่งกัน

จากการศึกษาการจัดระเบียบแบบแผนการติดต่อเชื่อมโยงของเซลล์ประสาทในชั้นที่ 5 ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ MEC และ LEC มีความจำเพาะในการส่งเส้นใยประสาทไปยังส่วนต่างๆของ nucleus accumbens โดยพบว่าเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ MEC ไปสิ้นสุดที่ส่วนหน้าของ nucleus accumbens ส่วนเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ LEC ไปสิ้นสุดที่ส่วนหลังของ nucleus accumbens เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Newman and Winans (1980) รวมทั้งผลการศึกษาของ Sorensen (1985) ตามที่กล่าวมาแล้ว

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า nucleus accumbens เป็นส่วนหนึ่งของ striatal complex ซึ่งประกอบด้วย caudatoputamen, nucleus accumbens และ olfactory tubercle ตั้งอยู่บริเวณพื้นของ anterior horn ของ lateral ventricle โครงสร้างของสมองส่วนนี้มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับบริเวณต่างๆของสมองที่อยู่ใน limbic system สันนิษฐานว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดความคิดปกติทางด้านพฤติกรรมและจิตใจ (Stevens, 1979; Robbins and Koob, 1980; Matthysse, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทดลองฉีดมอร์ฟินเข้าบริเวณ nucleus accumbens พบว่าทำให้เกิดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อชั่วคราว (catalepsy) (Dill and Costa, 1977) นอกจากนี้เมื่อทดลองฉีด ergometrin เข้า nucleus accumbens พบว่ามีการเคลื่อนไหวเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ (Pijnenberg *et al.*, 1973) การทดลองในหนูขาวเมื่อทำการอยแผล (lesion) ให้เกิดขึ้นในบริเวณ nucleus accumbens ทำให้เกิดการหลั่งน้ำนม (lactation) (Smith and Holland, 1975) และผลการทดลองในกระต่ายเมื่อกระตุ้นบริเวณนี้ด้วยไฟฟ้า พบว่าทำให้เกิดการตกไข่ (ovulation) (Kolkegami *et al.*, 1967)

จากผลการศึกษาที่ทราบว่า entorhinal cortex มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ hippocampal formation ในฐานะที่เป็นแหล่งรวบรวมและป้อนข้อมูลเข้าสู่วงจรภายในของ hippocampal formation ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการเรียนรู้และความจำขึ้นภายในสมอง ผลการศึกษาส่วนใหญ่ชี้ให้เห็นว่าเส้นใยประสาทที่นำกระแสประสาทจาก entorhinal cortex เข้าไปสู่ hippocampal formation นั้นมาจากชั้นที่ 2 และชั้นที่ 3 โดยผ่านเส้นทาง perforant pathway ตามที่กล่าวมาแล้ว สำหรับเส้นใยประสาทจากชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex ที่ไปยัง nucleus accumbens กล่าวได้ว่ายังมีการศึกษาในเรื่องนี้น้อยมาก จนปัจจุบันเรายังไม่รับทราบที่แท้จริงของ entorhinal cortex ต่อ nucleus accumbens ถึงแม้ว่าเรารู้หน้าที่บางประการของ nucleus accumbens ไปแล้วก็ตาม แต่ลักษณะความสัมพันธ์อย่างเป็นระบบจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับการศึกษาต่อไป

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทชั้นที่ 5 ของ entorhinal cortex มีลักษณะเช่นเดียวกับชั้นที่ 5 ของ neocortex จริง และพิสูจน์ให้เห็นว่าแท้ที่จริงเซลล์ประสาทชั้นที่ 4 ของ Lorente de No' (1933) ก็คือเซลล์ประสาทในชั้นที่ 5 ของ Jones (1984) ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้จึงสนับสนุนแนวความคิดที่คัดค้านการแบ่งสมองเป็นยุคต่างๆตามวิวัฒนาการ ซึ่งแบ่งสมองเป็น isocortex (neocortex) และ allocortex ว่าเป็นสิ่งที่ไม่น่าถูกต้อง (Ebbeson, 1980; Swanson, 1983;

Sripanidkulchai and Wyss 1987) อย่างไรก็ตามการที่ระบุว่า entorhinal cortex มีลักษณะเหมือน neocortex ทุกประการโดยอาศัยผลการทดลองนี้เพียงอย่างเดียวเป็นสิ่งที่ไม่ถูกต้อง จึงควรมีการศึกษาวิจัยถึงลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ประสาทชั้นอื่นร่วมด้วย เพื่อให้ได้เหตุผลและความถูกต้องมากยิ่งขึ้น