



# Forskningsårsrapport

Marius Tving Stauning

## Kollision af aktionspotentialer

**Hovedvejleder:** Christian Krarup **Projektvejleder:** Alfredo Gonzalez-Perez

Afleveringsdato: 27. januar 2014

## Abstract

**Objective** To examine if two opposing action potentials in the same axon will annihilate or pass through each other when they meet.

**Methods** The ventral nerve cord of the earthworm and nerves from the walking leg of the lobster is used. The nerves are stimulated simultaneously from both ends and the membrane potential is recorded. The recordings of the membrane potential are analysed and compared with subsequent recordings of the membrane potential under stimulation from each end separately.

**Results** All the examined lobster nerves show annihilation of the antidromic action potential. The ventral cord of the earthworm show reproducible examples of both annihilation and passage.

**Conclusion** The experiments indicate that two opposing action potentials will annihilate when they meet. However, further research is needed since the observed phenomena in the ventral nerve cord of the earthworm can not be explained.

## Resumé

**Formål** At undersøge om to modsatrettede aktionspotentialer i det samme axon vil kunne passere gennem hinanden, eller om der vil ske okklusion af nerveledningen.

**Metode** Der isoleres nerver fra hummerens gangben samt den centrale nervebane fra regnorm. Nerverne stimuleres simultant fra begge ender og membranpotentialet afledes med ekstracellulære elektroder. Den fremkomne registrering af membranpotentialet analyseres og sammenholdes med efterfølgende målinger foretaget ved stimulation af hver ende enkeltvis.

**Resultater** I samtlige undersøgte hummernerver ses okklusion. I regnormens centrale nervebane ses reproducerbare eksempler af både okklusion og passage.

**Konklusion** Forsøgene indikerer at to modsatrettede aktionspotentialer når de mødes vil udslukke hinanden. Dog er yderligere forskning nødvendig, da de observerede fænomener i regnormen endnu ikke kan forklares.

# Indhold

<b>Indhold</b>	<b>3</b>
<b>1 Introduktion</b>	<b>4</b>
<b>2 Metode og materialer</b>	<b>5</b>
2.1 Hummeren som forsøgsdyr . . . . .	5
2.2 Dissektion af hummer . . . . .	7
2.3 Regnormen som forsøgsdyr . . . . .	9
2.4 Dissektion af regnorm . . . . .	10
<b>3 Forsøgsopstilling og teoretisk forventede resultater</b>	<b>14</b>
<b>4 Forsøgsgang</b>	<b>16</b>
<b>5 Resultater</b>	<b>18</b>
5.1 Hummer . . . . .	18
5.2 Regnorm . . . . .	20
5.3 Refraktær perioden . . . . .	23
<b>6 Diskussion</b>	<b>24</b>
6.1 Tekniske fejl . . . . .	24
6.2 Dobbelt impuls . . . . .	25
6.3 Mere end et axon . . . . .	26
6.4 Ændrede fysiske parametre . . . . .	27
6.5 Soliton model . . . . .	28
6.6 Teoretiske forklaringer på de observerede fænomener indenfor Hodgkin-Huxley modellen . . . . .	31
6.7 Den anden vej rundt - passage er det generelle . . . . .	35
<b>7 Konklusion</b>	<b>36</b>
<b>A Optegnelse over forsøgsdata</b>	<b>38</b>
<b>B Nervekammeret</b>	<b>41</b>
<b>C Hardware og software</b>	<b>42</b>
<b>Litteratur</b>	<b>43</b>

# 1 Introduktion

Det er et bredt accepteret neurofysiologisk paradigme, at to modsatrettede aktionspotentialer, der mødes i det samme axon, vil udsukke hinanden, idet axonet på hver side af aktionspotentialet vil være i refraktær tilstand og ude af stand til at lede aktionspotentialet videre. Okklusion har i så høj grad status af paradigme, at der, på baggrund af dette, er udviklet anerkendte teknikker til at detektere aktionspotentialer i motorneuroner [13] samt til at måle hastighed af nerveimpulser [21]. Ikke desto mindre har endnu upublicerede forsøg, foretaget af Alfredo Gonzalez-Perez og Rima Budvytyte på Niels Bohr instituttet afdeling for biocomplexity, vist at der tilsyneladende uhindret sker passage af to aktionspotentialer. Der er desuden på Niels Bohr Instituttet udviklet termodynamiske modeller for nerveledning der, i modsætning til den alment accepterede model foreslået af Hodgkin og Huxley i 1952 [20], tillader passage af modsatrettede aktionspotentialer [2] [28] [3]. Det har ikke været muligt at finde fejl i apparatur eller forsøgsopstilling, der kunne forklare disse observationer. En efterfølgende litteratursøgning har efterfølgende vist at dette paradigme er særdeles dårligt belyst. For blot at nævne et enkelt eksempel gav en pubmed søgning foretaget 22-12-2013 med søgeprofil:

("action potentials"[MeSH Terms] OR "action potentials"[All Fields] OR "action potential"[All Fields]) AND collision[All Fields]

255 artikler. Disse blev gennemlæst for abstract og eller metode. Ingen af de fundne artikler havde som formål at undersøge, hvad der faktisk sker når to nerveimpulser møder hinanden, eller stillede spørgsmålstegn ved okklusion. Søgning på andre databaser gav lignende resultater. Ligesom søgning med andre søgeprofiler såsom "collision of nerveimpulses" eller "okklusion of antidromic actionpotentionals". Efter længere tids intenst søgning er det lykkedes at finde én artikel der beskriver fænomenet, "Collision of two nerveimpulses in the nerve fibre" af Ichiji Tasaki fra 1949 [44]. Denne artikel er dog på flere punkter mangelfuld idet der mangler opgørelse over antal forsøg, samt at de grafer der er vedlagt som bevis for Tasakis påstande praktisk talt er ulæselige. Da det står klart at et medicinsk paradigme således er baseret på et uhyggeligt spinkelt grundlag, samt at der eksisterer både eksperimentelle data og teoretiske modeller, hvis resultater direkte strider imod paradigmet, er der brug for yderligere undersøgelse af dette fænomen. I det følgende vil en gentagelse af det oprindelige forsøg blive gennemgået, samt kollisionsforsøg udført med hummernerver der anatomisk er mere simple og tættere på humane nerver. Alle nødvendige tilladelser til at udføre dyreforsøg er indhentet af Niels Bohr Instituttet.

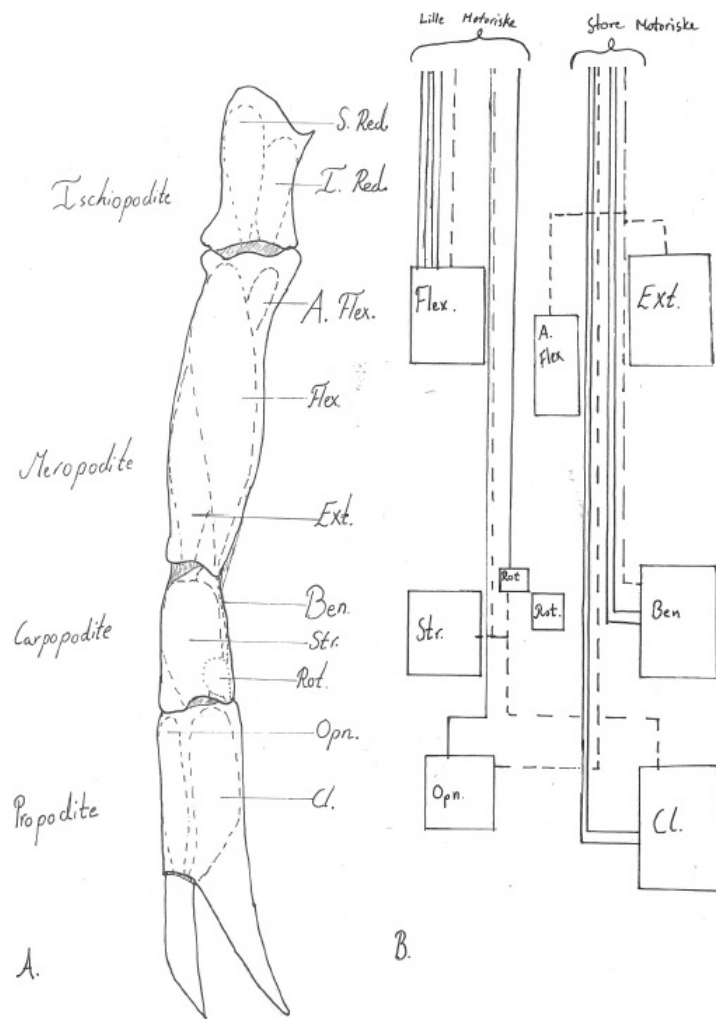


## 2 Metode og materialer

### 2.1 Hummeren som forsøgsdyr

I benene fra hummeren er de sensoriske og motoriske nervefibre samlet i tre nervebundter. Et stort primært sensorisk samt to motoriske. Nerverne har som liggende i ganglier i thorax eller abdommen og sender herfra ubrudte axoner ud til målcellerne. De motoriske axoner er myeliniserede med randvinske indsnøringer [16]. Det sensoriske bundt indeholder fibre til benenes følehår, hvori der er både kemo- og mekanoreceptorer. Det store motoriske nervebundt indeholder både inhibitoriske og excitatoriske axoner til den accessoriske flexor, den proximale extensor (extensor), den distale flexor (bender) og adductoren (closer) samt inhibitoriske axoner til abduktoren (opener) og rotator musklen. Det lille nervebundt indeholder både inhibitoriske og excitatoriske axoner til den proximale flexor (flexor), den distale extensor (strecher) samt excitatoriske axoner til abduktoren (opener) og rotator muskelen. [39] [49] [48] [47]. Figur 1 viser den motoriske nerveinnervation og tilhørende muskelplacering skematisk.

I det lille nervebundt afgår grenene til flexor muskulaturen ganske tidligt, og der er derfor et langt forløb med kun tre axoner tilstede, idet den excitatoriske fiber til abductor og distale extensor er samme axon, der forgrener sig, efter at den distale extensor er forsynet. Dette forløb med kun tre axoner er blevet eftervist histologisk [27] [26]. Det er værd at bemærke at rotatormusklen først er fundet i hummer efter Kravitz's histologiske billeder er taget, da det er en ganske lille muskel med en meget begrænset funktion. Kravitz beskriver på billederne små grene af de to store axoner - disse gren kan meget vel være forsyningen til rotatormuskulaturen, men dette har ikke kunnet fastslås med sikkerhed. Under alle omstændigheder består forsyningen til rotator muskulaturen af fibre med så ringe en diameter, at nervebundtet for alle praktiske formål kan betragtes som bestående af blot to axoner. Enkelte af de små motoriske nervebundter, der indgår i forsøgene, er blevet undersøgt under mikroskop og der er her bekræftet eksistensen af kun to synlige axoner. Det er primært det lille nervebundt, der bruges til forsøgene, da der her er det simpleste system; men enkelte forsøg udføres også med det store motoriske nervebundt samt med det sensoriske.

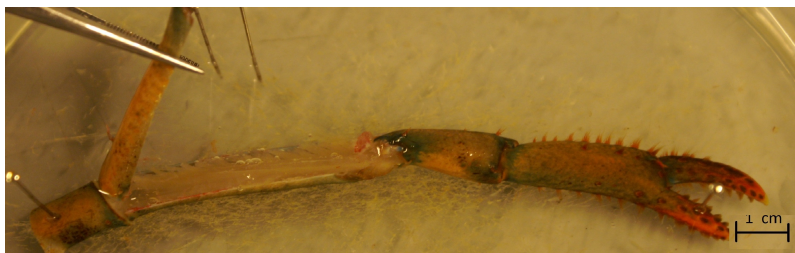


Figur 1: A: Et venstre gangben set posteriort. Den brugte notation er den i litteraturen hyppigst forekomne. S.Red=Superior reduktor, I.Red= Inferior reduktor, A.flex= Accessorisk flexor, Flex= Flexor, Ext= Extensor, Ben= Bender, Str=Strecher, Rot=Rotator, Opn= Opener, Cl= Closer. B: Nerveforsyningen i store og lille motoriske bundt, notation er som i A, brudte linjer indikerer en inhibitorisk forbindelse, hele linjer en excitatorisk forbindelse. Figurer er baseret på [47] og [46]

## 2.2 Dissektion af hummer

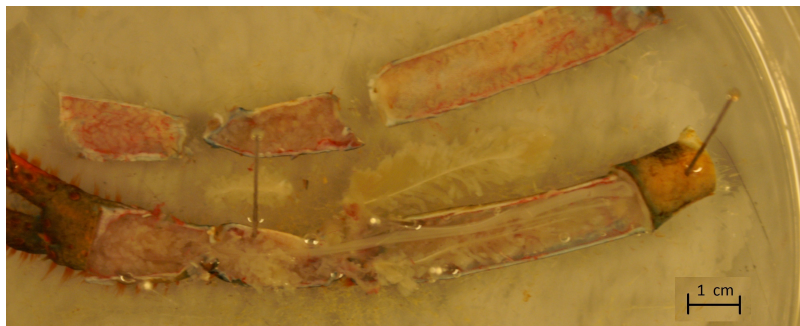
Hummeren er canadisk hummer af typen *Hummerus Americanus*, der købes hos en lokal fiskehandler, *Fiskerikajen, Frederiksborggade 21, 1360 København K*, umiddelbart inden dissektion. Fra hummeren bruges nervefibre isoleret fra klør samt fra 1,2 og i enkelte tilfælde 3. gangben.

Inden dissektionen køles hummeren ved  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  i en halv time. Nedkølingen tjener som delvis bedøvelse og sløver hummerens bevægelser. Efter nedkølingen affives hummeren straks ved halshugning, således at hjernen skilles fra resten af kroppen. Der skal lægges stor kraft i kniven, da der ellers vil ske kun delvis halshugning. Efter affivning af hummeren, fjernes ben og klør så tæt på kroppen som muligt. Det er muligt at opnå funktionelle nerver fra klør og ben på 3. dagen efter affivning, så længe disse har været opbevaret køligt (2-5 grader celcius), dækket af ringervæske og først færdigdissekeres umiddelbart inden de skal bruges. Nedkøling skal ske hurtigst muligt efter klør og ben er adskilt fra kroppen. Den anvendte ringervæske består af: 465 mM NaCl, 2 mM KCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$  samt 3 mM Glucose til 1 liter demineraliseret vand. Ved at tilsætte små mængder (mindre end en millimol) TRISS buffer justeres pH til mellem 7,35 og 7,5 ganske små mængder er som regel tilstrækkeligt. Ringervæsken er i store træk baseret på J.C. Daltons analyser af hummerblod og intestinalvæske [11], men er blevet tilført glucose da dette erfaringsmæssigt har vist at øge levetiden for nervevævet markant. Det frigjorte ben placeres med den anteriore side mod underlaget i en gummifyldt petriskål. Benet dækkes med ringervæske og for at holde temperaturen så lav som mulig tilsættes isterninger. For ikke at forrykke ionkoncentrationerne, i takt med at isterningerne smelter, laves disse af ringervæsken. Med en saks eller skalpel flækkes skallen langs den laterale og mediale kant i Mero- Carpo- og propodite segmentet. Herefter fastgøres benet til underlaget med knappenåle. Forsigtigt løftes skallen, og med en skalpel frigøres muskel og fascia fra denne.

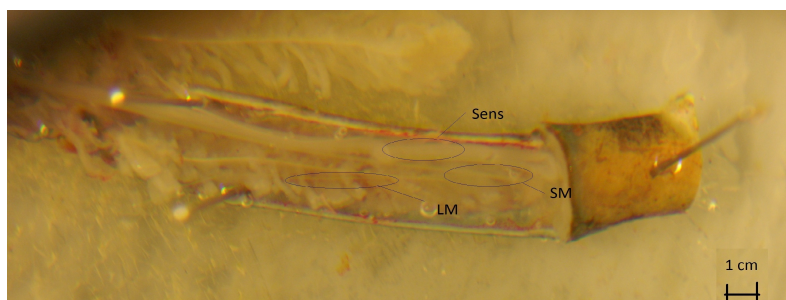


Figur 2: *Fastgjort 2. venstre gangben*

Med en pincet løftes den øverste muskel og frigøres med en saks fra de underliggende strukturer, således at nervebanerne blotlægges. De næste segmenter åbnes på samme vis som det første, og det mindre nervebundt lokaliseres.



Figur 3: *De blotlagte nerver*



Figur 4: *LM=lille motorisk bundt, SM=Store motorisk bundt, Sens=Sensorisk bundt*

Foruden spredte bindevævs strøg mellem nerveskederne omkring det sensoriske og store motoriske nervebundt, er nerverne kun sparsomt adhæreret til omgivende strukturer og kan nemt løsnes. Stump og forsigtig dissektion er kraftigt at foretrække, idet muskler og nervebaner drejer en halv til en kvart omgang.

Dissektionen følger i store træk Wen Hui Wus dissektion af krebs [50], men inddrager flere segmenter for at få en så lang nervefiber som muligt. Der opleves en vis anatomisk variation de enkelte hummere imellem. Ofte ses det, at bindevævsskeden omkring det sensoriske nervebundt er ufuldstændig, og denne derfor fremtræder som flere spredte fibre. Disse kan af og til forveksles med en motorisk nervebane. Det kan her være en fordel at vente med at frigøre den ønskede nerve indtil sidste segment, hvor de anatomiske forhold kan blive lettere at overskue.

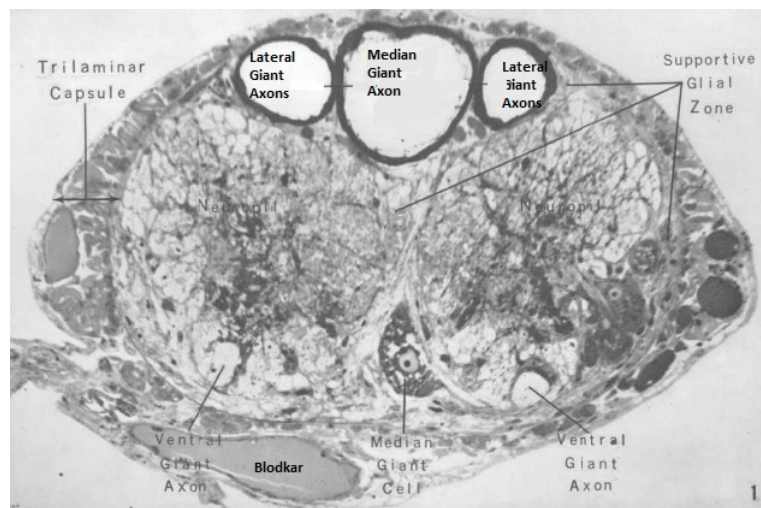
Dissektionen af kloen er en smule mere krævende, men til gengæld kan der opnås betydeligt længere nerver. Da skallen er betydelig tykkere, kræves et lille bor til at åbne selve kloen. En knibtang kan bruges i mangel på bedre, men dette

kan få skallen til at splintre ukontrolleret og derved besværliggøre dissektionen eller ligefrem ødelægge nerverne. Resten af dissektionen forløber på samme vis som for gangbenene, idet anatomien er den samme, blot med større muskler. Dog ses der i kloen en større indbyrdes rotation af de enkelte segmenter, ligesom det er betydeligt sværere at fastgøre kloen til underlaget, hvorfor dissektionen er mere tidskrævende og kræver særlig omhyggelig og systematisk dissektion.

Med øvelse tager dissektion af gangben 15- 10 minutter, mens der må påregnes omtrent 30 minutter til dissektion af klo.

### 2.3 Regnormen som forsøgsdyr

Regnormens neurale forhold er særdeles godt beskrevet såvel makro som mikroskopisk. Et tværsnit gennem den centrale nervebane, i litteraturen ofte henført til som "the ventral nervecord", viser følgende opbygning:



Figur 5: Billedet er fra [9] Billedet er blevet bearbejdet for at tydeliggøre placering af de dorsale median og laterale giant axons

De dorsale axoner er omgivet af myalin, og der er påvist saltatorisk ledning [18]. De ventrale axoner er ikke omgivet af myalin men af talrige små nervefibre, der i lysmikroskop kan forveksles med myalin [9]

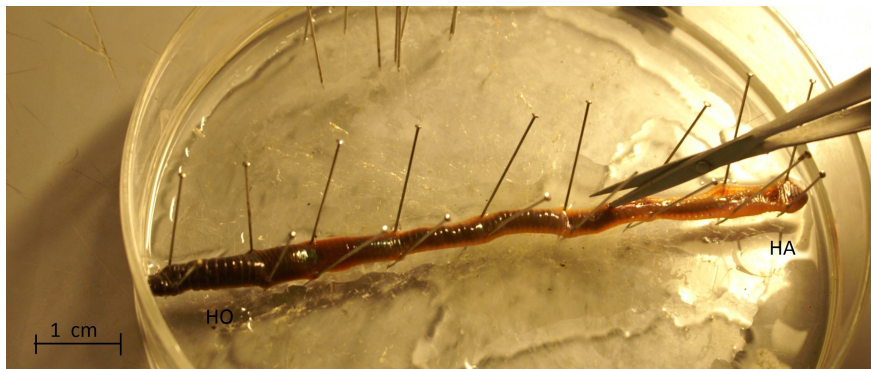
Der kan afledes to aktionspotentialer fra de dorsale axoner, et fra det mediane axon samt et fra de to laterale axoner. De laterale axoner er elektrisk forbundne og derfor synkroniserede [38]. Aktionspotentialer fra de ventrale nervebaner der ses på tværsnit i figur 5, kan ikke med det udstyr der bruges i forsøgene skelnes fra den gængse støj på målingerne.

I forhold til hummeren er regnormens neurale opbygning mere kompleks. Regnormens tre dorsale fibre er segmentalt opbygget og består af kæder af se-

rieforbundne axoner. Dette er først vist af Stough [41] i 1926 ved lysmikroskopi og siden hen verificeret ved blandt andet elektronmikroskopi [17] [24]. Der er rapporteret op til 85 % af samlingerne i medianfibren og 60 % i de laterale fibre er egentlige syncita med fusion af axonernes axoplasma[17]. De resterende segmenter er samlet ved desmosmer og nexus. Nexus tillader passage af partikler op til 1000 mol wt [7] og har en specifik resistans i størrelsesordenen  $5,9 \Omega$  pr.  $\text{cm}^2$ , hvilket giver i omegnen af en faktor tusind højere ledningsevne end selve membranen [6]. Selvom det er vist, at den mediane nervefiber og de laterale nervefibre in vivo leder impulser i hver sin retning [42], viser både egne og tidligere forsøg at nervefibrene er bidirektionelle, [38] hvilket gør, at den mediane såvel som de to laterale fibre, fra et elektrofysiologisk synspunkt, hver i sær kan ses som ét langt kabel bestående af flere serieforbundne afgrænsede kabler sat sammen af resistorer med ringe modstand. En sådan opbygning er et generelt billede indenfor gruppen af ledorme. [34]

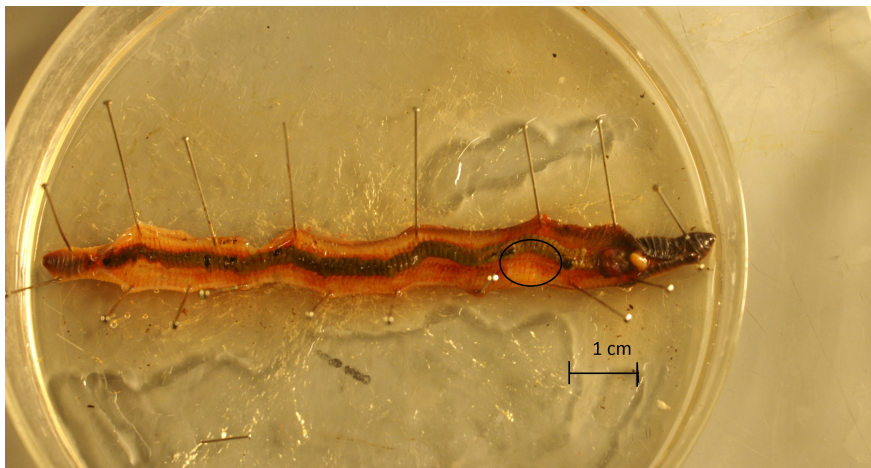
## 2.4 Dissektion af regnorm

Regnormen købes fra en lokal forhandler af lystfisker udstyr, *Jans Lystfiskershop, Ndr. Frihavsgade 47, 2100 KBH.. Ø* og er af typen *Lubricus Testis*, populært Giant Canadian Nighth Crawler. Regnormene købes i jordfyldte kasser med tolv orme i hver kan, når de opbevares heri i køleskab ved  $4^\circ\text{C}$ , overleve flere måneder. Regnormene vejer mellem 2,3 og 3 gram, gennemsnitligt 2,5 gram. Før dissektionen placeres regnormen i en 10% volumen opløsning af ethanol og postevand i ca 10 - 15 minutter indtil der ikke længere finder bevægelse sted. Dette tjener til bedøvelse og pacificering af regnormen under den efterfølgende dissektion. [33]. Bedøvelsen er reversibel og har ingen betydning for den senere nerveledning [38] Den bedøvede regnorm placeres herefter i en gummibeklædt petri skål og fastgøres til underlaget med knappenåle. Knappenålene bør ikke sættes med mere end 1-2 centimeters mellemrum, da der undervejs i dissektionen kan fremkomme muskelkontraktioner på trods af, at regnormen er bedøvet. Regnormen placeres så den dorsale side er fri af underlaget. Den dorsale side er let genkendelig, da den er betydelig mørkere end den ventrale. Med en skalpel laves en lille incision på tværs i hale enden af regnormen. Halen kendes ved at være mindre og mere fladtrykt end hovedenden, der er karakteristisk tyk og spids. En saks indføres i incisionen, og regnormen åbnes på langs. Det er vigtigt at udvise stor forsigtighed undervejs, så ruptur af colon undgås.



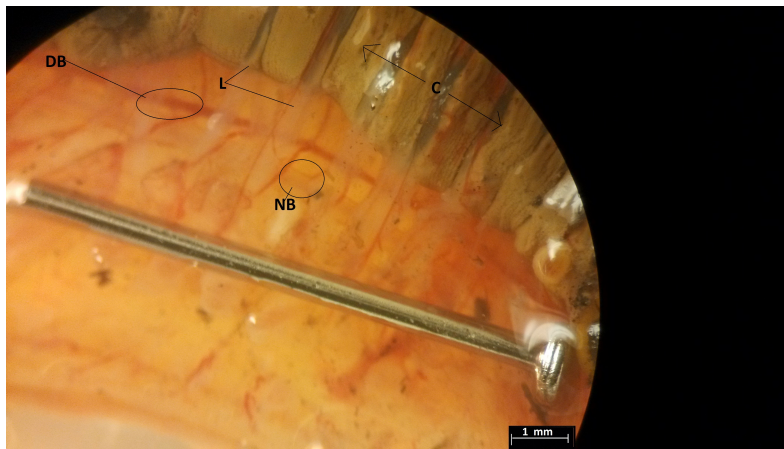
Figur 6: *Regnorm fastgjort til underlaget. HO= Hoved, HA=Hale*

Den resterende del af dissektionen foregår under mikroskop. Colon er fastgjort til regnormens sider med 2 - 3 rækker af ligamenter på hver side. Med en pincet løftes op i randene langs incisionen og samtlige ligamenter i den første række på hver side af incisionen klippes over. Herefter kan regnormens sider krænges til side og fastgøres med knappenåle til underlaget, således at colon er fuldt blotlagt. Regnormens centrale nervebane er placeret direkte under colon, og det er ofte muligt at skimte denne samt et større blodkar dorsalt for nervebanen.



Figur 7: *Regnorm efter første række af ligamenter er frigjort og colon blotlagt, det markerede område svarer til figur 8*





Figur 8: *Det med cirkel markerede område i figur 7. DB= Dorsalt blodkar, L= Ligamenter der fastgør colon, NB= Centrale nervebane, C= Colon*

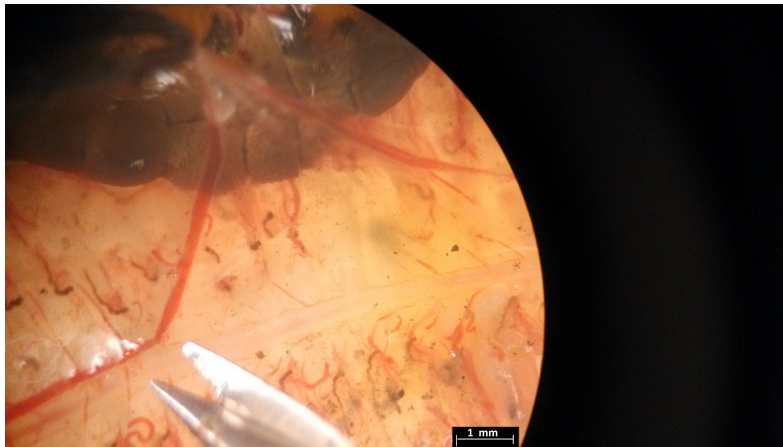
Samtlige ligamenter fjernes nu i den ene side og colon skubbes bort. En del af ligamenterne vil indeholde små blodkar, blod herfra samt snavs fra eventuel colon ruptur kan med fordel skylles væk med ringervæsken.



Figur 9: *Den blottagte nervebane efter colon er skubbet til siden, pilene viser placering af den centrale nervebane og dorsale blodkar*

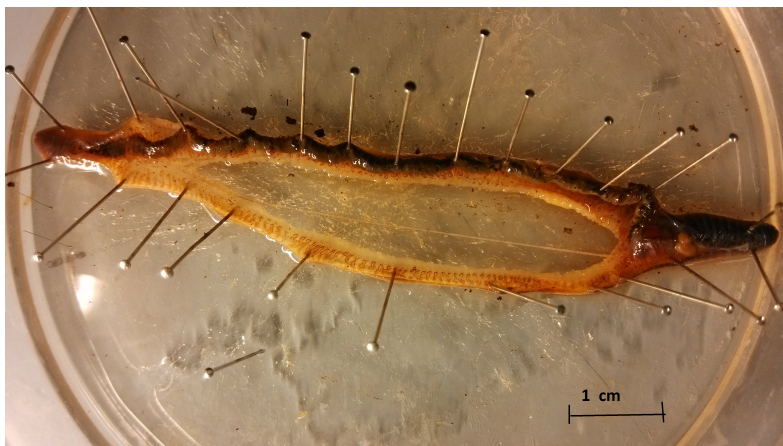
Det dorsale blodkar fjernes ved at løfte det med en pincet og herefter fjerne de små kar der løber ind i nervebanen. Der er ligeledes lokaliseret et mindre blodkar ventralt for nervebanen, men det er praktisk ikke muligt at fjerne dette uden at beskadige nervebanen.





Figur 10: *Fjernelse af det dorsale blodkar, NB= Nervebane, DB= Dorsalt blodkar*

Selve nervebanen er fastgjort med en række ligamenter på hver side samt en enkelt række ventralt for nervebanen. Disse ligamenter indeholder foruden bindevæv også efferente og afferente nervefibre. Forsigtigt fjernes samtlige af disse ligamenter. Særligt ved de ventrale rækker kan nervebanen let beskadiges. Når samtlige synlige ligamenter er brudt, skæres et snit i det underliggende muskellag langs nervebanen og nervebanen skubbes ud i denne. Denne procedure gør det markant lettere at kontrollere, om der skulle være ubrudte ligamenter tilstede. Et forsøg på at flytte nervebanen mens den stadig er tilhæftet muskellaget kan nemt føre til beskadigelse.



Figur 11: *Nervebane frigjort fra muskellaget*

Nervebanen frigøres i hoved- såvel som haleende og løftes over i nervekammeret. Undervejs i dissektionen dryppes regnormen ofte, hvert 2. - 5. minut, med

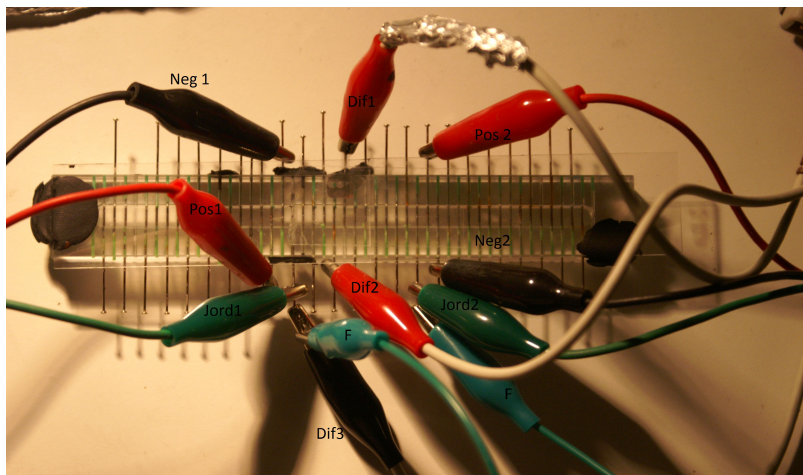
ringervæske indeholdende 75 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM TRIS buffer samt 23 mM glucose til 1 liter demineraliseret vand og med en pH der er justeret til 7,4 ved tilførsel af et par få dråber 1 M NaOH eller HCL. Ringervæsken er i baseret på Pax og Drewes analyser af intestinalvæske fra regnorm [36] og skal løbende tilføres nervebanen for at undgå udtørring. Med øvelse kan en dissektion, afhængigt af regnormens længde, udføres på omtrent en og en halv time. Som forsøgsdyr er regnormen, i modsætning til hummeren, yderst hårdfør. Det er muligt, så længe den centrale nervebane er tilstrækkeligt fugtet, at afbryde dissektionen i op til en time, hvis regnormen efterlades ved stuetemperatur, for herefter at genoptage dissektionen og stadig få funktionelle nerveprøver. Efterlades regnormen i køleskab ved 2 - 5 °C, kan dissektionen afbrydes i halve til hele døgn. Det er ligeledes muligt, at efterlade den dissekerede nervebane i nervekammeret i køleskab natten over og herefter med succes genoptage de elektrofysiologiske forsøg. Rushton har tidligere rapporteret en lignende hårdhed af regnormenerven [38].

### 3 Forsøgsopstilling og teoretisk forventede resultater

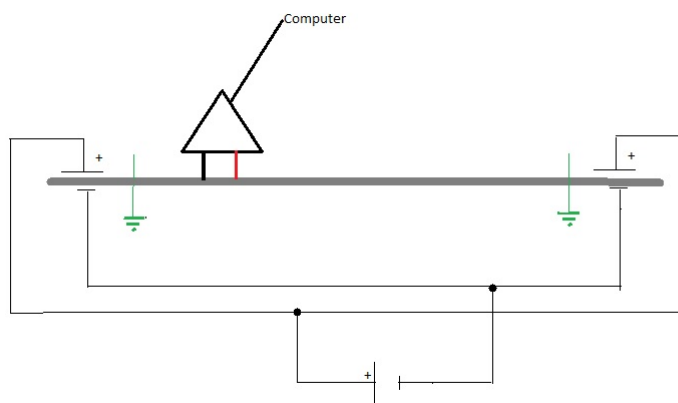
I alle forsøg bruges det samme nervekammer. Nervekammeret består af en pentaxskinne, hvori der er skåret en fordybning og fra siden indsat knappenåle med 2,5 millimeters mellemrum. Knappenålene er fastgjort med en ikke ledende tokomponent polymer. Knappenålene er fremstillet af stål og har en diameter på 0,6 mm. Nerven er placeret ovenpå disse knappenåle, der tilsluttes måle- og stimulerings elektroder samt jordforbindelser. Se appendiks for detaljerede tegninger af nervekammeret.

Nervekammeret tilsluttes et sæt stimuleringselektroder i hver ende, samt et sæt måleelektroder mellem de to stimuleringssteder. Mellem stimulus- og måleelektroderne tilsluttes en jordforbindelse. Denne skal forhindre stimulusstrømmen i at løbe langs nerven og mindske stimulusartefaktets størrelse på målingerne. I bunden af kammeret placeres et par dråber ringervæske og kammeret lukkes tæt til med en glasplade, der fastgøres med voks. En tynd papirstrimmel i bunden af kammeret bryder overfladespændingen på vanddråberne, således at væsken fordeles og der forhindres kontakt mellem væske og elektroder. Fordampning af væske fra bunden af kammeret vil holde nervefibren fugtig og øge den tid hvori nerven er funktionsdygtig. Det er af og til muligt at placere en ufunktionsdygtig nerve i ringervæske i 30 sekunder til 1 minut og herved genetablere ledningsevnen. Under forsøgene er nerven er ikke omgivet af væske, da dette ligeledes vil skabe kortslutning mellem stimulus- og måleelektroder. Figur

12 viser tilslutningerne til nervekammeret, mens figur 13 viser samme tilslutning skematisk.



Figur 12: Pos1, Neg1 & Jord1 = Anode, Katode og jordforbindelse til første stimulussted. Pos2, Neg2 & Jord2 = Anode, Katode og jordforbindelse til andet stimulussted. Dif1, 2 & 3 = Anode, Katode og jord forbindelse til differentialforstærker. F = Kabel der forbinder de tre jord



Figur 13:

Måleelektroderne placeres forskudt for midtlinjen således at de to aktionspotentialer når frem til måleelektroden med forskellig latenstid. Dette giver følgende muligheder for registrering af aktionspotentialer, når begge ender stimuleres simultant:

**1. Der sker okklusion når de to aktionspotentialer mødes.** Eftersom de to aktionspotentialer mødes, efter aktionspotentialet med den mindste latenstid allerede har passeret måleelektroden, vil aktionspotentialet med den mindste latenstid stadig blive registeret og ses på målingerne til samme tid og med uændret amplitude, som ved enkelt stimulation. Dette aktionspotential vil være det eneste der ses, da aktionspotentialet med størst latenstid aldrig når frem til måleelektroden.

**2. Der sker passage når de to aktionspotentialer mødes.** Såfremt de to aktionspotentialer kan passere hinanden, vil begge aktionspotentialer blive registeret og ses på målingen. Aktionspotentialerne vil hver især have samme amplitude og latenstid som ved enkelt stimulation.

**3. Delvis okklusion.** Som tidligere beskrevet er der for hummerens lille motoriske nerve, for alle praktiske formål, tale om en nerve med to axoner, der er derfor her også tale om en tredje mulighed, nemlig at der sker en delvis okklusion, således at der sker okklusion i det ene axon men passage i det andet. Ved en sådan situation vil der på målingerne ses aktionspotentialet med korteste latenstid med fuld amplitude, mens aktionspotentialet med størst latenstid vil ses med halv amplitude i forhold til enkelt stimulation. Såfremt der er tale om en meget lang nerve, kan aktionspotentialet med størst latenstid splittes op i to separate aktionspotentialer. Hvis der, i dette tilfælde, sker en delvis okklusion, vil kun den ene af disse to aktionspotentialer ses på målingerne.

## 4 Forsøgsgang

Først stimuleres nerven enkeltvis fra de to stimuleringselektroder, og det kontrolleres, at der er kan opnås signal fra begge ender af nervefibren. Når tærskelværdien er fundet, stimuleres nerven simultant fra begge ender. Efter dette stimuleres nervefibren igen enkeltvis fra begge ender for at kontrollere, at der stadig kan opnås signal. Dette gentages, så der opnås så mange cykli som muligt fra den enkelte nervefiber. For hver cyklus bestående af dobbelt stimulation efterfulgt af enkelt stimulation noteres det, om der sker okkulsion eller ej. Kan der ikke ved enkeltstimulation opnås et signal fra begge ender efter dobbeltstimulationen, tages en sådan cyklus ikke med i optællingen. For hummeren medførte dette, at 17 cykli ikke medtages i den endelige optælling, mens det for regnormen drejede sig om 3 cykli. Ingen af disse målinger viste tegn på passage.

Afhængigt af hvor længe nervefibren kan holdes funktionsdygtig, testes nerven også for refraktærperiode. Til bestemmelse af refraktær periode bruges et sæt stimuleringselektroder og et sæt måleelektroder. Stimuleringen indstilles til

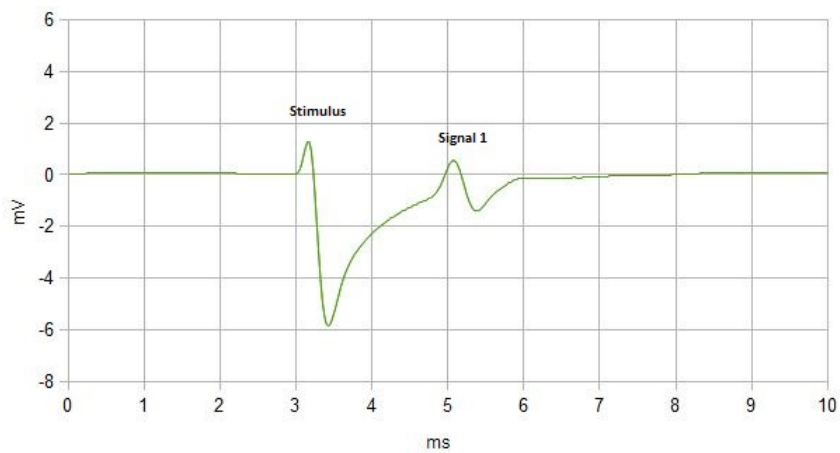
en dobbeltpuls, hvor hver puls er lig tærskelværdien. Forsinkelsen mindskes herefter, indtil der kun opnås et enkelt aktionspotentialer. Den forsinkelse, der lige akkurat giver to aktionspotentialer, regnes for den absolutte refraktærperiode. Herefter øges styrken af den anden puls til det dobbelte af den første og forsøget gentages. Den nu fundne tid regnes som summen af den absolutte og relative refraktærperiode. Den relative refraktær periode fås ved subtraktion af de to fundne værdier.

I alle forsøg er den beskrevne forsøgsgang samt apparatur ens for hummer og regnorm. Medmindre andet fremgår, foregår alle forsøg ved stuetemperatur. I alle forsøg bruges PowerLab 26T fra ADInstruments til både stimulation og måling. Data opsamles via den indbyggede BIO Amp og analyseres ved hjælp af det medfølgende LabChart7 software. Se appendiks for uddybende produkt-specifikationer. Følgende Bio Amp filtre anvendes ved opsamling af data for at minimere støj, 2 kHz Low pass filter samt 0,5 Hz High pass. Desuden lægges der efter dataopsamlingen et 100 Hz high Pass digitalt filter på målingerne. I modsætningen til Bio Amp filtrene er det digitale filter reversibelt.

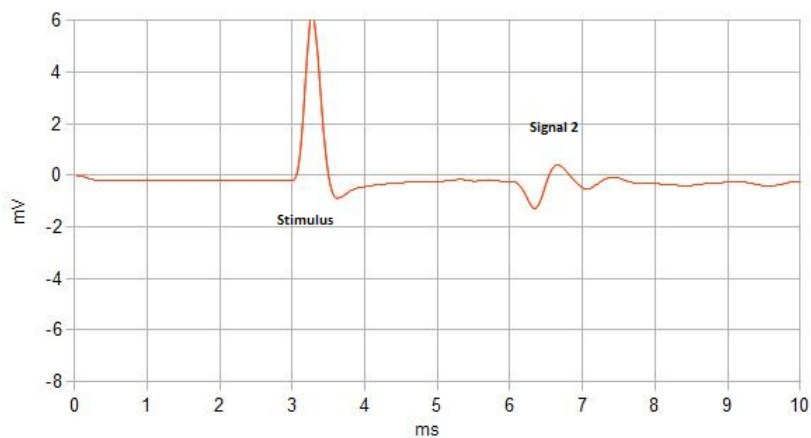
## 5 Resultater

### 5.1 Hummer

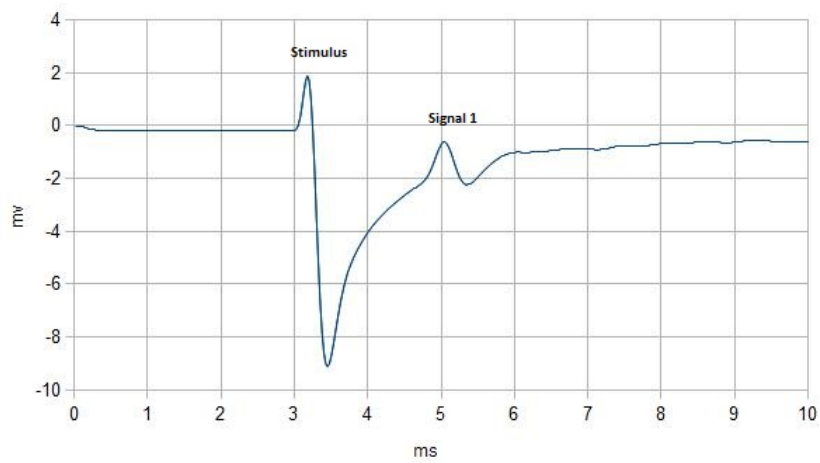
I alt udføres forsøg med 15 nerver fra fire forskellige hummere. Der udføres et varierende antal cykli pr. nerve. Figur 14 - 16 viser en sammenhængende cyklus for hummernerverne foretaget 17/10-2013. Ved både enkelt og dobbeltstimulation stimuleres med 3V og en pulsbredde på 0,05 ms. Denne cyklus fortolkes, som okklusion af nerveledningen.



Figur 14: *Enkeltstimulation fra elektrode tættest på måleelektrode*



Figur 15: *Enkeltstimulation fra elektrode længst fra måleelektrode*



Figur 16: *Simultan stimulation fra begge stimuleringssteder*

Sammenfattet er resultatene for hummernerverne:

Nervetype	Antal unikke nerver	Antal cycli i alt	Okklusion påvist	Okklusion ikke påvist
Lille motoriske bundt	7	22	22	0
Store motoriske bundt	5	35	35	0
Sensoriske bundt	2	21	21	0

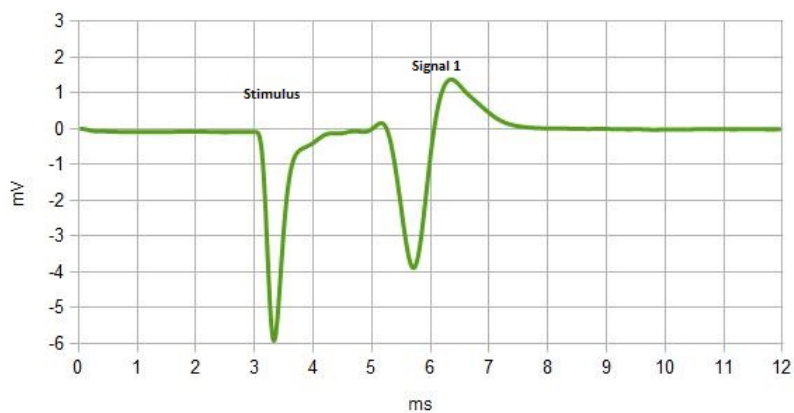
Se appendiks for uddybende resultater.

## 5.2 Regnorm

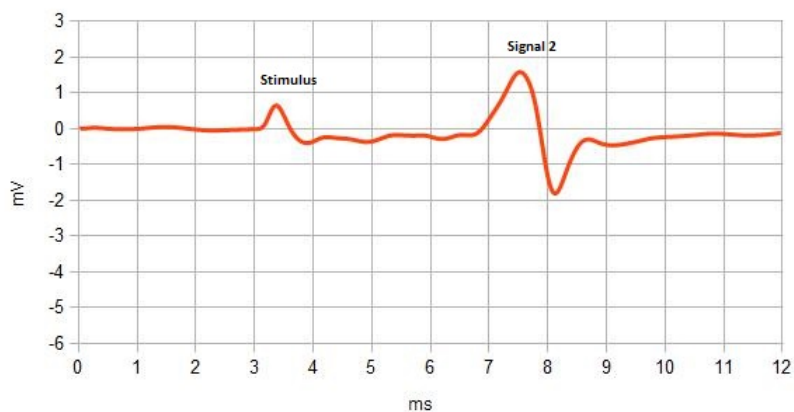
Der udføres succesfulde forsøg med 7 nerver fra 7 forskellige regnorme. Interessant er det, at der både ses reproducerbare tilfælde af okklusion og passage.

### Måleserie 1 - Okklusion af nerveledningen

Figur 17 - 19 viser en sammenhængende målerække foretaget 6/10 -2013. Ved både enkelt og dobbelt stimulation bruges 0,4 V og pulsbredde på 0,05 ms måleserien tolkes som okklusion.

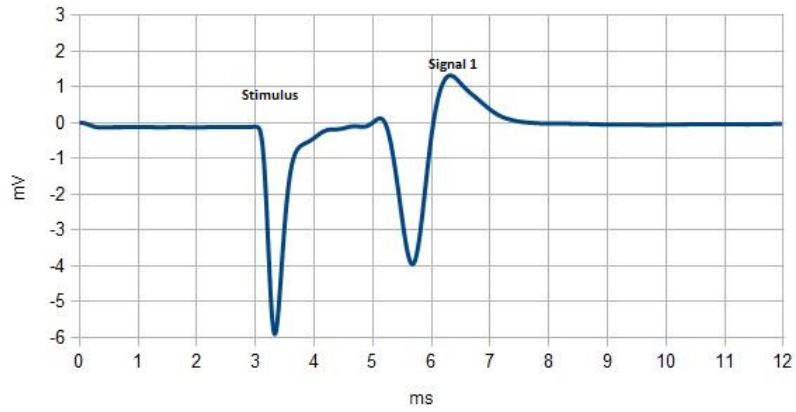


Figur 17: *Enkeltstimulation 5 millimeter fra måleelektrode*



Figur 18: *Enkeltstimulation 17,5 millimeter fra måleelektrode*

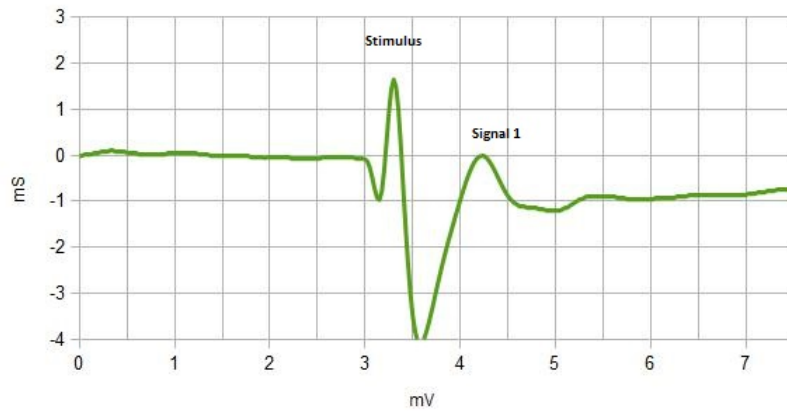




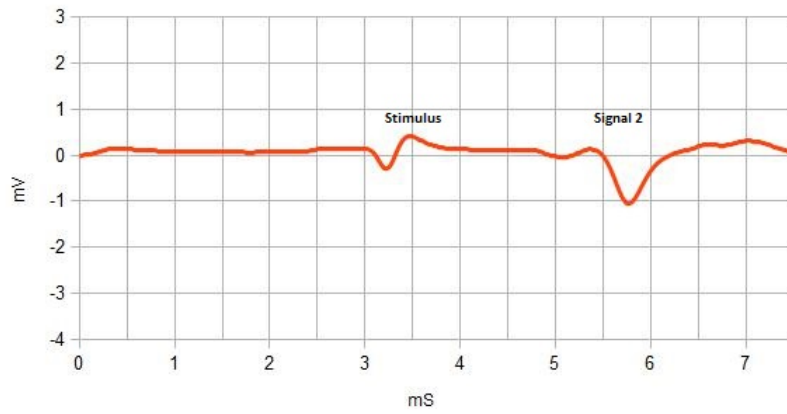
Figur 19: *Simultan stimulation både 5 millimeter og 17,5 millimeter fra måle-  
elektrode*

### Måleserie 2 - passage af aktionspotentialer

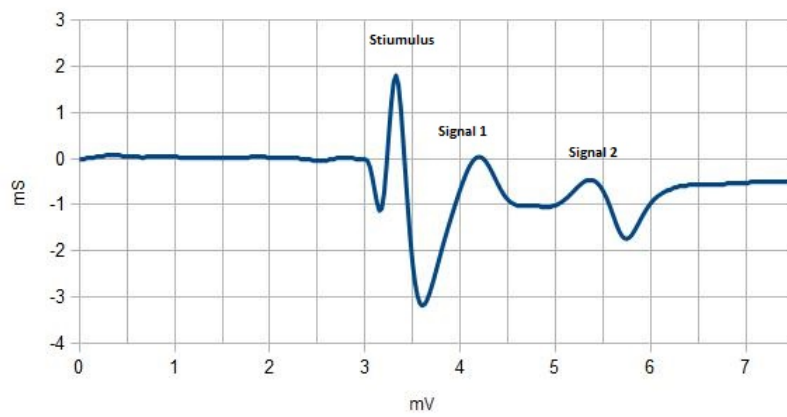
Figur 22 - 21 viser en sammenhængende målerække foretaget 17/01 -2013. Ved både enkelt og dobbelt stimulation bruges 0,6 V og pulsbredde på 0,05 ms måleserien tolkes som okklusion



Figur 20: *Enkeltstimulation 2,5 millimeter fra måleelektrode*



Figur 21: *Enkeltstimulation 12,5 millimeter fra målelektrode*



Figur 22: *Simultan stimulation både 2,5 millimeter og 12,5 millimeter fra målelektrode*

Sammenfattet er resultaterne for regnormen:

Nervetype	Okklusion påvist	Okklusion ikke påvist
Regnorm	33	21

Se appendiks for uddybende resultater.

I alle på nær én nervebane var det muligt både at påvise okklusion og passage i den samme regnorm når nervebanen blev flyttet i forhold til måle- og stimuleringselektroderne. Det var aldrig muligt at påvise begge resultater i det samme stykke af nervebanen. I den ene nerve hvor det ikke lykkedes at påvise begge resultater, blev det ikke forsøgt at flytte måle- og stimuleringselektroderne, da nerven ikke var funktionsdygtig i tilstrækkelig lang tid.

### 5.3 Refraktær perioden

Både regnorm og hummer viser refraktær periode. Gennemsnittet for hummeren er en total refraktær periode på 4 ms hvor den absolutte udgøres af 1,5 ms og den relative 2,5 ms, mens det for regnormen er totalt 2,1 ms, hvor den absolutte udgør 1,6 ms og den relative 0,5 ms. Datamaterialet er for småt til udregning af et præcist gennemsnit, men det vigtigste i forhold til de videre forsøg er, at samtlige nerverne viser tegn på at have refraktær periode. Dette er i overensstemmelse med, hvad der tidligere er vist for regnormen [14] [38]. Der er ikke fundet tilsvarende optegnelser for hummeren.

## 6 Diskussion

### 6.1 Tekniske fejl

Da der er gøret med en meget simpel forsøgsopstilling, er der ikke rum for de store fejl i forsøget. Forsøgsopstillingen er blevet grundigt gennemgået, og hvor det har været muligt, er der foretaget kalibreringer og nulstillinger. Dette havde ingen effekt på resultatet af målingerne. Ligeledes er der lavet forsøg med og uden filtre og med jordforbindelserne i alternative positioner eller helt uden jordforbindelse. Dette ændrer ikke ved det overordnede resultat om både passage og okklusion i regnormen samt okklusion i hummeren, men øger blot mængden af målestøj markant. Ligeledes er der forsøgt alle tænkeligt mulige fejltilslutninger mellem kabler og måleudstyr. Dette resulterer enten i samme overordnede resultater eller så store mængder målestøj at videre eksperimenter umuliggøres. Det virker derfor usandsynligt, at resultaterne skulle være fremkommet som konsekvens af fejl, der ikke blev opdaget undervejs. Muligheden for en systematisk fejl på udstyret kan også med rimelighed udelukkes, idet der bruges det eksakt samme udstyr i alle forsøgene, og forsøgene med hummer og regnorm foregår sideløbende med hinanden. En dag arbejdes der med hummer, den næste med regnorm, og af og til med begge på den samme dag. Det er utænkeligt med en systematisk fejl, der diskriminerer mellem de to forsøgsdyr og højst usandsynligt med en tilfældig fejl, der kun rammer den ene type forsøg. Fejl på udstyret burde give mere ens resultater hvor der både ses okklusion og passage i begge dyr. Der kan spekuleres i om den manuelle analyse af de registrerede potentialer udgør en fejlkilde. Den mest præcise måde, men også mest tidskrævende måde, ville være rent matematisk at fratække et potentiale afledt efter enkelt stimulation fra potentialet afledt ved dobbeltstimulation. Denne fremgangsmåde ville kunne afsløre, en situation hvor aktionspotentialerne havde passeret hinanden, men stadig blev set som kun et aktionspotentiale som følge af overlap de enkelte aktionspotentialer imellem eller overlap mellem aktionspotentialer og stimulusartefakt. For at kontrollere om dette har været en fejlkilde, analyseres to resultatsæt fra korte nerver igen efter ovenstående metode. Dette ændrer ikke resultatet, og da der ved okklusion altid har været tale om at det er aktionspotentialet med den største latenstid der "forsvinder", samt at aktionspotentialerne med forskellig latenstid generelt er vel separerede og kun i enkelte tilfælde har mindre overlap, regnes det ikke for nødvendigt med yderligere matematisk analyse.

## 6.2 Dobbel impuls

For resultaterne i regnormen kan der spekuleres i, om vævet omkring det mediane axon på kan fungere som en kapacitor og oplade dele af den spænding, der skabes under stimuleringen, for så senere at aflade og generere et ekstra aktionspotential, således at det, der ses ved målelektrode som to aktionspotentialerne, der har passeret hinanden, i virkeligheden er to aktionspotentialer, der kommer fra samme ende. Det er tidligere beskrevet, at der kan fås gentagne aktionspotentialer efter enkeltstimulation med meget høje stimulusstyrker, samt at der kan ses et *"after discharge"* med lav amplitude efter enkelt stimulation af den mediane nerve fiber. [23] [8]

En række forhold gør dog, at dette ikke kan være tilfældet i de udførte regnormeforsøg. For det første burde der i så fald også ses gentagne aktionspotentialer ved enkeltstimulation. Dette har ikke været tilfældet, hverken ved de stimulus der bruges til kollisionforsøgene, eller ved højere stimulus. For det andet ses de to aktionspotentialer, ved den tilsyneladende passage, at være spejlbilleder af hinanden. Dette sker som et rent teknisk fænomen idet aktionspotentialet måles med differentialforstærker med de to elektroder, der udgør målesættet en smule forskudt fra hinanden. Spejlbillederne opstår idet aktionspotentialerne fra hver sin ende møder en forskellig elektrode først. Spejlbillederne viser derved, at der netop er tale om aktionspotentialer fra hver sin ende. Ligeledes er det højst usandsynligt, at et tilfældigt *"after discharge"* skulle falde tidsmæssigt lige akkurat så, det er identisk med aktionspotentialet, der kommer fra modsatte ende, specielt når det tages i betragtning, at afstanden mellem måle- og stimuleringselektroder har været forskellig ved de forskellige nerver.

Det er også utænkeligt med en fejl på udstyret, der skulle gøre at de to stimuleringselektroder ikke aktiveres simultant, og aktionspotentialet fra den ene stimuleringselektrode når at passere den anden stimuleringselektrode, inden der her genereres et aktionspotential, således at der fås en falsk positiv passage. Ud over at tilslutningen af stimuleringselektroderne på ingen måde burde tillade dette, viser stimulusartefaktet desuden, at aktiveringen af de to stimuleringselektroder sker simultant. Stimulusartefaktet ved enkeltstimulering er tidsmæssigt sammenfaldende med det, der opnås ved dobbeltstimulering. Stimulusartefaktet er et far-field-potential, der kun registreres, når der løber en strøm ved stimuleringselektroderne. Løb der derfor en strøm i de to sæt stimulerings elektroder til forskellige tider, ville der ses to og ikke et stimulusartefakt.

### 6.3 Mere end et axon

Det er velbeskrevet i litteraturen, at den mediane og de laterale axoner i regnormens centrale nervebane ændrer tykkelse undervejs i deres forløb. Således er det mediane axon i hovedenden klart tykkere end de laterale, mens de i haleenden er tæt på samme diameter [32]. Dette betyder, at forskellen mellem tærskelværdierne løbende mindskes. Der er enkelte beskrivelser af, at det mediane axons tærskelværdi i den yderste del af halen kan overstige tærskelværdien for de laterale [14] [38]. Dette blev dog aldrig observeret i de beskrevne forsøg. Det mediane axon havde altid lavest tærskelværdi, og det var kun sjældent, de absolutte yderpunkter af regnormen blev anvendt. For yderligere at teste om der, ved den tilsyneladende passage i regnormen, blot ses et lateralt signal fra den ene ende og et medialt signal fra den anden, måles hastighed af aktionspotentialerne fra begge ender ved at indsætte et ekstra sæt måleelektroder. Hastigheden udregnes som afstanden mellem disse over tidsforskellen. Der er ingen nærmere afvigelse i hastigheden, og da det er velbeskrevet at hastigheden af aktionspotentialer i de laterale axoner er omtrent det halve af hastigheden i det mediane axon [34] [38] [14] [4] [32] [25], virker det usandsynligt, at der ved passagen skulle være tale om aktionspotentialer der ikke begge løber i den samme nervefiber.

Med hensyn til hummernerverne, er der i litteraturen er vis inkonsistens med hensyn til hvilke axoner der er beliggende i henholdsvis det store og det lille motoriske nervebundt. Ligeledes blev der i de beskrevne forsøg i enkelte tilfælde under mikroskop registreret flere axoner end de to forventede. Dette kan skyldes anatomiske variationer de enkelte hummere imellem, eller skyldes at det lille motoriske nervebundt og det store motoriske nervebundt under dissektionen er blevet forvekslet med hinanden. Under alle omstændigheder vil ekstra axoner i hummernerven ikke kunne forklare at der tilsyneladende sker okklusion. Havde der været tale om passage af aktionspotentialerne i hummeren, ville de ekstra axoner kunne være en forklaring, idet aktionspotentialerne kunne tænkes, at løbe i hver sit axon. Usikkerheden på målingerne stiger dog markant, når der bruges nervebundter, der indeholder flere axoner, som det er tilfældet med det store motoriske bundt og det sensoriske bundt. Det kan gøre det meget vanskeligt at analysere målingerne, da det ikke kan vides med sikkerhed, at alle axoner aktiveres hver gang fra begge ender, ligesom de sammensatte aktionspotentialer kan være adskillige millisekunder brede og kan overlape hinanden. Resultaterne fra det store motoriske nervebundt og det sensoriske bundt er derfor kun taget med, idet der var tale om ganske lange nerver med en tydelig adskillelse mellem aktionspotentialerne fra hver ende og der blev observeret en tydelig og udslukning af det sammensatte aktionspotentiale med størst latenstid.

## 6.4 Ændrede fysiske parametre

### Temperatur

Det kan virke paradoksalt, at temperaturen holdes nede under dissektionen af hummer men ikke under selve forsøgene, idet nerven er af så beskeden diameter, at den hurtigt må opvarmes til stuetemperatur. Erfaring fra forsøgene viser dog, at nerver der dissekeres under ringervæske med stuetemperatur er af markant dårligere kvalitet med hensyn til levetid. En mulig forklaring kan være inflammatoriske mediatorer, der frigives fra hummervævet ved stuetemperatur og ødelægger nerven. Disse vil ikke være tilstede, når nerven i nervekammeret opvarmes til stuetemperatur, hvorfor nerven ikke tager skade. Det har ikke været muligt at teste denne hypotese.

En anden mulighed er, at hummernerven er en så isoleret struktur, at den ikke opvarmes i nervekammeret, men holder en stabil lav temperatur. For at teste om en sådan mulig forskel i temperatur kan forklare forskellen mellem regnorm og hummer, tages i alt 3 regnormenerver hvori der er vist passage af aktionspotentialer og placeres i køleskab i 3 timer. Herefter gentages forsøget straks. Der fås samme resultat med afkølede regnormenerver, som med regnormenerver ved stuetemperatur. Eneste forskel er, at aktionspotentialernes hastighed er formindsket i de afkølede nerver, mens bredden af samme er øget. Dette er helt i overensstemmelse med tidligere observationer [12] [20] [25]. Der ses ikke en faldende tærskelværdi selvom dette tidligere er blevet rapporteret [12]. Overordnet er der intet der tyder på at temperaturen har haft betydning for, om der sker okklusion eller ej. At der i regnorm både fås okklusion og passage taler yderligere imod dette. Det har ikke været muligt at opnå funktionsdygtige nerver fra hummer, der inden dissektionen er blevet tempereret til stuetemperatur.

### Tryk

Begge forsøgsdyr har været opbevaret ved noget nær samme trykforhold gennem længere tid, og alle forsøg foregik i et laboratorium, hvor trykændringerne aldrig var større end forskellen i det daglige barometertryk. Der er derfor ingen grund til at tro, trykket kan have udgjort en betydende faktor, og dette er derfor ikke blevet undersøgt nærmere.

### Stimulusstyrken

Enkelte gange ses der i hummeren delvis passage af det sammensatte aktionspotentialer, såfremt det store sensoriske nervebundt benyttes. Denne passage kan fjernes, såfremt stimulusstyrken øges, i overensstemmelse med at axonerne må formodes at ændre diameter undervejs i forløbet, og alle axonerne derfor ikke

har været aktiveret i begge ender, hvorfor der er axoner, hvor der ingen kollision finder sted og derfor heller ikke ses okklusion.

For at teste om dette forhold også gør sig gældende i regnormen, øges stimulus spændingen i en række forsøg med op til 600%. Dette ændrer ikke ved, at der ses tilsyneladende passage af aktionspotentialerne i nogle segmenter og okklusion i andre segmenter. Blot fås der af og til også signaler fra de laterale nervebaner.

Ved både hummer og regnorm ses det, som forsøgene skrider frem, at der kræves en større stimulus styrke for at opnå et aktionspotentiale. Dette kan skyldes udtørring af nerven, tab af ioner, eller ødelæggelse af membranstrukturer som følge af gentagne stimuli. Kravet til stimulusstyrker stiger gradvist, men blev aldrig observeret at falde. Det er således højst usandsynligt med en situation hvor det "manglende" signal ved okklusion skyldes at tærskelværdien i den ene ende af axonet er steget, såfremt der kan påvises aktionspotentialer fra begge ender ved den efterfølgende enkeltstimulering med samme stimulusintensitet.

Såvel passage som okklusion er fundet ved både høje og lave stimulusstyrker, og sålænge stimulusstyrken er over tærskelværdien for alle axoner i begge ender af den pågældende nervefiber, er der intet, der tyder på at stimulusstyrken har betydning for, om der sker okklusion eller ej. Det skal dog nævnes, at der ved forsøg udført af andre i samme laboratorium, er observeret tilsyneladende passage af aktionspotentialer ved forsøg udført med det sensoriske bundt fra hummeren, hvor denne passage ikke forsvinder, eller kun forsvinder delvist, ved øgning af stimulusstyrken til udstyrets maksimum (8V). Dette kan skyldes, at der i det sensoriske bundt er axoner, der ikke løber hele vejen gennem bundtet. Dette har ikke været undersøgt nærmere. Vanskelighederne ved at bruge en stor blandet nerve understreger, hvorfor en human udgave af de beskrevne forsøg vil være særdeles vanskeligt at udføre og få pålidelige resultater fra.

## 6.5 Soliton model

Som nævnt i introduktionen, er der udviklet alternative modeller for udbredelsen af aktionspotentialet end den hidtil mest anerkendte - Hodgkin-Huxley modellen. [20]. Kort fortalt, beskriver Hodgkin-Huxley nervemembranen som et kredsløb med en konstant kapacitet og variable og individuelle resistorer for en natrium, en kalium og en leak strøm henover membranen. Disse resistorer og derved konduktansen for de enkelte ioner, er det eneste, der kan varieres og er afhængige af membranpotentialet samt tid, membranpotentialet er den udløsende faktor. Hodgkin-Huxley beskriver således aktionspotentialet som et rent elektrisk fænomen i det den kun inkluderer en beskrivelse ionstrømme ind og ud af cellen[20]. Indenfor Hodgkin-Huxley modellens begrebsverden vil to



aktionspotentialer ikke kunne passere hinanden i det der umiddelbart bag det propagerende aktionspotentiale vil være en del af membranen, der er ude af stand til at generere et nyt aktionspotentiale, idet de resistorer (ionkanaler) ansvarlige for dette vil være i en låst tilstand, hvor et ændret membranpotentiale ikke vil føre til en ændret ledningsevne gennem membranen. I modsætning til Hodgkin-Huxley modellen står solitonmodellen, der er baseret på termodynamik og derfor inkluderer en række faktorer, der ikke selvstændigt er omfattet af Hodgkin-Huxley modellen såsom ændring i entropi, temperatur og nervetykkelse. I soliton modellen er selve nervesignalet båret af en non-linær solitær mekanisk bølge, der forplanter sig gennem membranen. Denne bølge er tæt forbundet med en fase translation mellem en flydende og fast fase af lipidmembranen, der ved fysiologiske temperaturer befinder sig kun ganske lidt over sit smeltepunkt. [3] Den observerede ændring af membranpotentialet der ses sammen med et nervesignal er i soliton modellen primært begrundet i, at membranens kapacitans vil ændre sig som konsekvens af at membranetykkelsen ændres. Soliton modellen er stadig i brede kredse ukendt, men giver dog en bedre forklaring på en række fænomener, der ikke er dækket af Hodgkin-Huxley, så som at der i forbindelse med et nervesignal ses en ændring af axondiameter [43], at netto varmeudvekslingen under et aktionspotentiale er lig nul. [1] [37], at der i kunstigt fremstillede lipidmembraner uden proteiner, eksperimentalt har kunnet opnå ændringer i membranpotentialet, som efterligner de ændringer, der i nervecellen tilskrives ionkanaler [19] [5], samt at det er vist, at der kan opnås progeredierende nervesignaler ved mekanisk påvirkning af axonet [22]. Solitonmodellen beskriver en hvis refraktærperiode, idet der er en maksimum frekvens et tog af aktionspotentialer vil kunne opnå [45]. Alligevel viser computersimulationer, at to enkeltstående aktionspotentialer der møder hinanden i nervefibren vil opføre sig som en perfekt soliton og passere uhindret gennem hinanden med kun et yderste beskedent tab af energi. [2] [28]

Observationerne af okklusion i regnormen, kan til dels forklares ud fra solitonmodellen, idet der i de foretagne beregninger ikke er taget højde for de nexus, der forbinder axonerne, og det kan tænkes, at dette ændrer solitonens opførsel.

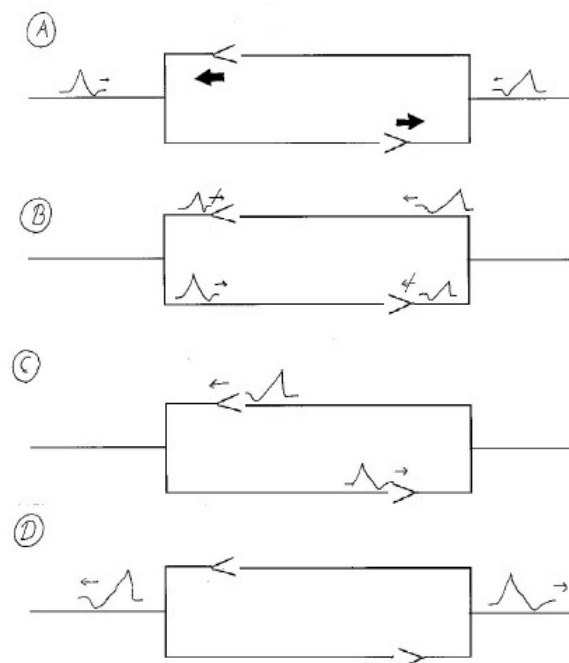
Observationerne af okklusion i hummeren er straks sværere at forklare. Såfremt aktionspotentialerne, som forudsagt i soliton modellen, uhindret passerer hinanden, kræves der en systematisk fejlkilde for at forklare billedet af den manglende passage i hummer nerverne. En teoretisk mulighed, er at der mellem de to stimuleringselektroder sker en cross-talk, når de begge aktiveres simultant. Udover at det ikke har været muligt at finde litterære kilder, der beskriver en sådan fejlkilde, taler to forhold imod dette: For det første virker det usandsynligt, at dette kun skulle ramme hummeren og ikke regnorme nerven. I regnorme nerven er der set både passage og okklusion med den samme afstand mellem

stimuleringselektroderne og ved stimulusstyrker, der både i den høje og den lave ende af skalaen modsvarer stimulusstyrker brugt ved hummerforsøgene, og det virker derfor ikke sandsynligt at den okklusion der observeres her skyldes en krydsforbindelse mellem elektroderne. Specielt ikke når det tages med i betragtningen, at der i regnormen aldrig blev vist begge resultater i det samme nervesegment. For det andet er hummernerverne i nogle tilfælde op til mere end dobbelt så lange som regnormenerverne, hvorfor effekten af en krydsforbindelse burde være mindre i hummer, og der burde ses passage. Andre tekniske fejl må som tidligere beskrevet regnes for usandsynlige.

Selvom dette forsøgs data ikke umiddelbart er i 100 % overensstemmelse med solitonmodellens forudsigelser, ville det være at gå for vidt, at anse selve solitonmodellen som modbevist. Langt mere sandsynligt er det, at der i de foretagne beregninger kan mangle en række forudsætninger, der i praksis er anderledes end teoretisk antaget, således at der for to modsatrettede nerveimpulser ligesom for ensrettede impulser vil være en minimal afstand, der er mulig mellem to bølger. Ligeledes skal det påpeges, at hvis man på baggrund af dette forsøgs data vil afskrive soliton modellen, retmæssigt også ville være nødt til at afskrive Hodgkin-Huxley modellen, hvis forudsigelser om okklusion ligeledes ikke er i 100 % overensstemmelse med forsøgets resultater.

## 6.6 Teoretiske forklaringer på de observerede fænomener indenfor Hodgkin-Huxley modellen

Det bedste bud på en "simpel"teoretisk løsning på de observerede passager af aktionspotentialer i regnormen vil være en anatomisk struktur, hvor synapsen mellem to axoner består af to unidirektionelle men modsatrettede synapser. I et sådant system vil der kunne ledes et aktionspotentiale i begge retninger i det aktionspotentialerne, såfremt de når denne synapse samtidig, her kan passere forbi hinanden uden at mødes. Figur 12 viser denne situation grafisk:

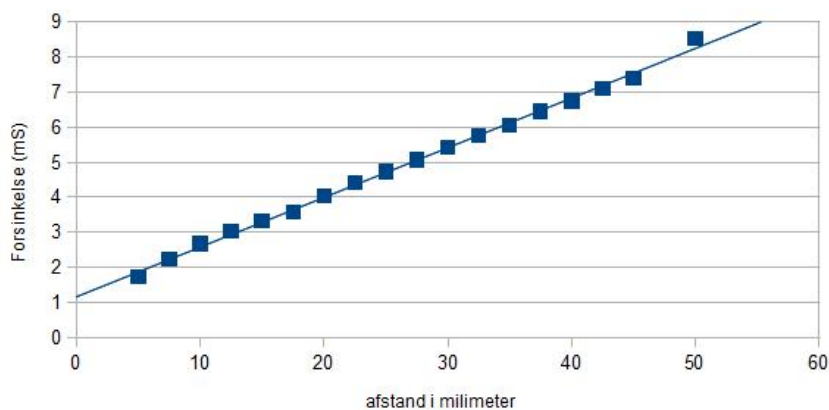


Figur 23: A) To modsatrettede aktionspotentialer når samtidig frem til synapsen, de store pile viser hvilken vej den unidirektionelle synapse vil lede. B) Aktionspotentialerne deler sig i de to grene af axonet, i den ene gren udslukkes aktionspotentialerne som følge af unidirektionaliteten. C) Aktionspotentialerne i den anden forgrening fortsætter uhindret og passerer uden om hinanden. D) Aktionspotentialerne passerer uhindret over synapsen og fortsætter langs axonet i det der måles som en tilsyneladende passage.

En af de første der beskæftiger sig med regnormens neurale forhold, er Stough, der i 1926 om nervebanens struktur skriver at der er: "regions near or posterior to, the middle of the cord. Here the median fiber break up into from three to sixteen or more processes"[41]. Før ham beskriver Freudlander "ekstra fibre" i det mediane giant axon som konsekvens af en, i følge ham, abnormal regeneration, [15] lige såvel som Colilin inden ham har beskrevet ekstra

fibre [10]. Senere har Mulloney påpeget 3 forgreninger af den mediane fiber [33], uden dog nærmere at specificere, hvor disse forgreninger løber hen. Friedlanders påstand om, at der sker en regeneration fra både den proximale og distale del af et overrevet axon, er blevet eftervist idet det er vist at begge axon stumper overlever og udsender en eller flere neuritter efter en overskæring af den centrale nervebane [31] [4] [29]. Et gennemsnit på 1,9 neurit pr. axon stump er nævnt for det mediane giant axon [31]. Det er derfor ikke helt utænkeligt, at det anatomiske grundlag, med en opsplitning af det mediane giant axon, er tilstede. Dog må det kræves at der enten regelmæssigt sker brud og regeneration, eller at der er tale om en mere generel struktur som beskrevet af Stough, for at det er tilstrækkeligt til at stemme overens med, at der i et overvejende flertal af forsøgene er set passage.

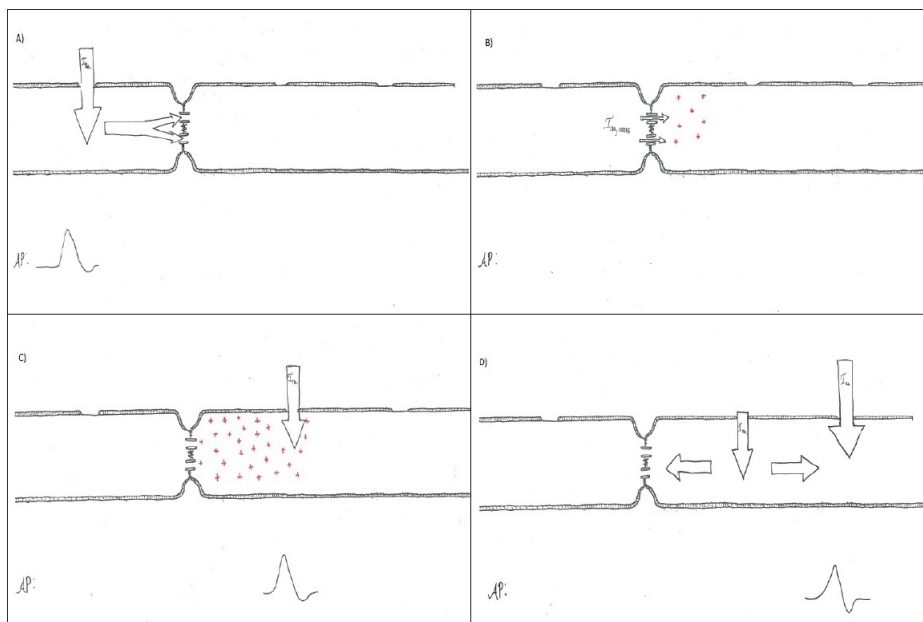
Spørgsmålet om unidirektionalitet er det næste der presser sig på. Det letteste ville være at indføre en kemisk synapse, der af natur er unidirektional. Der er spredte observationer af vesikler samlet omkring nervesamlingerne i regnormen [35] [24], og for at teste om disse er kemiske synapser udføres forsøg hvor aktionspotentialer måles i varierende afstand til stimulusstedet. Forsinkelse plottes herefter som funktion af afstanden og ekstrapoleres til skæring med 2. akse. Er der tale om et rent kabel vil der ses skæring i origo, mens der ved en kemisk synapse vil ses stor forsinkelse. Resultatet er som følger:



Figur 24: Forsinkelse som funktion af tiden

Den observerede forsinkelse ligger et stykke under, hvad der måtte forventes for en kemisk synapse, særligt når det tages i betragtning at der er tale om forsinkelse målt over en hel nervebane bestående af mange forbundne axoner, således at der er tale om mindst et tocifret antal synapser.

Det står herved ganske klart, at det mest sandsynlige er en ledning af aktionspotentialer der, som tidligere beskrevet, foregår gennem nexus og inden spørgsmålet omkring unidirektionalitet kan angribes må det overvejes, hvordan aktionspotentialer passerer gennem en nexus. Figur 25 viser dette grafisk. For overblikkets skyld er kun medtaget den initiale natriumstrøm, da denne er ansvarlig for videreførelsen af aktionspotentialer.



Figur 25: Aktionspotentialer gennem en nexus. A) Aktionspotentialer i det første axon når frem til sidste randvinske indsnævring inden nexus og skaber her en indadgående strøm af natrium ioner, disse spredes gennem nexus til det tilstødende axon B) Strømmen igennem nexus vil gradvist depolarisere det tilstødende axon C) Såfremt strømmen gennem nexus er tilstrækkelig stor og langvarig vil det tilstødende axon nå tærskelværdi, og en ny indadgående natrium strøm skabes D) Aktionspotentialer i det tilstødende axon vil fortsætte uden yderligere forsinkelse

Fra ovenstående står det klart at størrelse og hastighed for strømmen gennem nexus afhænger af: 1) Den absolutte mængde af ioner der flyttes ved den indadgående natriumstrøm i det første axon. 2) Det første axons evne til at fordele de overskydende natriumioner andre steder. 3) Størrelse og antal af nexus.

Forestiller man sig nu en nexus, der forbinder to axoner med indbyrdes meget forskellige volumina, opstår den krævede unidirektionalitet let. Den strøm, der skabes fra det lille til det store axon, kan formodes at være utilstrækkelig til det store axons membran, når sin tærskelværdi, eller være tilstrækkelig, men blive overdøvet af en kraftigere modsatrettet strøm, når der også sker et

aktionspotentialer i det store axon. En lignende mekanisme for ledning gennem nexus har været foreslået for at forklare, at der hos regnormen i nervebaner, der vokser sammen efter et brud, inden det egentlige aktionspotential, kan ses en række små *prepotentials*, der normalt ikke observeres, samt for at forklare at der ligeledes kan observeres at enkelte nervebaner efter regenerationen går fra at være bi- til unidirektionelle [30] [31]

Endvidere har der været spekulationer fremme om at visse former for nexus i sig selv skulle være "forudindtagede" og lettere tillade passage af aktionspotentialer i en retning frem for en anden. [40]

Med en opbygning af centralnervesystemet som ovenstående ville regnormen have den fordel at kunne sende signaler i samme retning hurtigt ved hjælp af en enkelt fiber og således spare en fiber væk. Om dette er tilfældet i den levende regnorm, kan der kun gisnes om. Ligesom der kun kan gisnes om, om det overhovedet har en praktisk betydning eller blot er en anatomisk variation. Det må påpeges at denne mulige forklaring er bygget på spredte og ofte ældre henvisninger og der såvidt vides ikke eksisterer noget entydigt bevis for det nødvendige anatomiske grundlag. Yderligere forskning vil derfor være nødvendig for at fastslå den egentlige mekanisme bag nerveledningen i regnormens centrale nervebane. Et forsøg, hvor et nervesegment, svarende til afstanden mellem to sæt stimuleringselektroder, hvor imellem der er forekommet passage, efterfølgende fikseres og undersøges lysmikroskopisk ved tværsnit i den fulde længde, og sammenlignes med et tilsvarende segment hvor der har fundet okklusion sted, kunne være første skridt. Såfremt der findes forskellige anatomiske strukturer i de to segmenter, vil dette styrke teorien. En efterfølgende elektronmikroskopisk undersøgelse vil kunne afklare om den krævede nexusstruktur og fordeling er til stede.

Teorien vil effektivt kunne modbevise såfremt et stykke af det mediane axon, der ikke indeholder nexus, kan identificeres, for eksempel ved hjælp af et fluorescerende sporstof med specifik binding til nexus proteiner, og der i dette isolerede segment kan ses passage af to modsatrettede aktionspotentialer.

## 6.7 Den anden vej rundt - passage er det generelle

Accepteres den i punkt 6.6 beskrevne struktur med en synapse der udviser præference for at lede aktionspotentialer i en retning fremfor en anden, er det muligt også at konstruere en nerveopbygning der, under forudsætning af at to nerveimpulser uhindret kan passere hinanden, kan forklare de observerede okklusioner i regnormen. Synapsen vil bevirke, at aktionspotentialerne, såfremt de mødes her, kun vil fortsætte i en retning. En sådan nerveopbygning i regnormen er ud fra de nuværende forsøg præcis lige så sandsynlig, som nerveopbygningen beskrevet i punkt 6.6, men rejser det problem, at der, indenfor denne forklaringsramme, ingen forklaring er for de observerede okklusioner i hummernerven - medmindre man er villig til at acceptere, at der skulle gælde forskellige regler for nerveledning i de to forsøgsdyr. Skal passage være det generelle billede i hummernerven, kræves der som tidligere en systematisk fejlkilde i forsøgene. Som gennemgået under punkt 6.1 og 6.5 har det ikke været muligt at sandsynliggøre eksistensen af en sådan fejlkilde.

Teorien om at passage er det generelle i regnormen, og at synapserne skal forklare den tilsyneladende okklusion vil kunne modbevises, hvis der kan identificeres en strækning af nervebanen uden tilstedeværelse af nexus, og der her forekommer okklusion af nerveimpulserne. Under alle omstændigheder bør der laves yderligere forsøg med enkelte isolerede axoner, fra flere forskellige arter af dyreriget for at kunne fastslå, at okklusion er det generelle billede. Indtil sådanne forsøg foreligger må det, slet og ret i mangel på dokumentation, ud fra et teoretisk synspunkt, regnes som en mulighed, at der ikke altid sker okklusion, når to modsatrettede aktionspotentialer mødes.

## 7 Konklusion

Helt nøgternt er konklusionen på de ovenstående forsøg, at nerveledningen i regnormens centrale nervebane ikke opfører sig som forventet for et enkelt axon. Grunden til dette stadig er ukendt. Der er i regnormen observeret både tilsyneladende passage og okklusion af aktionspotentialerne. Den overvejende statistik for okklusion i hummernerver indikerer, at dette er det generelle billede, men langt flere forsøg i langt flere dyreracer er påkrævet hvis okklusion fortsat skal kunne forsvares som et dogme indenfor neurofysiologien. Der er angivet en teoretisk model, der kan forklare den tilsyneladende passage af aktionspotentialer i regnormen, men det skal understreges, at denne model i bedste fald må regnes som spekulativ og nærmere skal ses som et forslag til videre forskningsområder end nogen egentlig forklaring. Under alle omstændigheder må de beskrevne observationer tages med i overvejelserne, når regnorm i fremtiden bruges som lære- og forskningsmodel. Indtil en solid forklaring på de observerede fænomener er tilvejebragt bør regnorm kun bruges som model hvis ikke andet er muligt.





## Billag

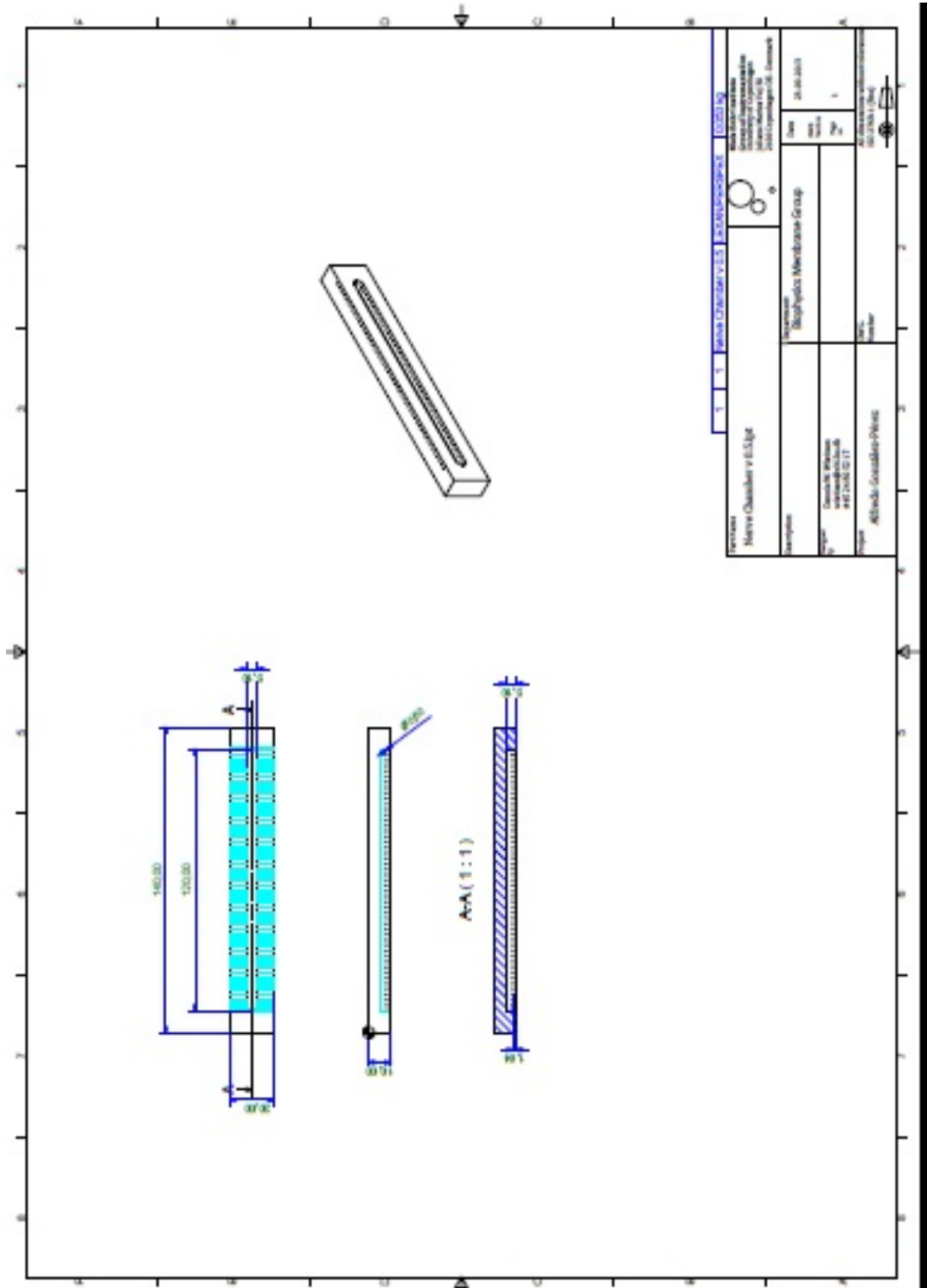
### A Optegnelse over forsøgsdata

Hummer 1, 680 gram, xxx centimeter										
Dato	Organ	Nervetype	Funktionel længde	Tærskel værdi, V	Mindste stimulus-strøm, V	Antal cycli	Okklusion påvist	Okklusion ikke påvist	Okklusion delvise cycli der ikke medtages	
17/10-2013	Højre Klo	Lille mek	Ikke målt	3	3	1	1	0	0	
18/10-2013	2.Venstre gangben	Lille mek	Ikke målt	0,5	0,6	1	0	0	0	
Hummer 2, 700 gram, xxx centimeter										
Dato	Organ	Nervetype	Funktionel længde	Tærskel værdi, V	Mindste stimulus-strøm, V	Antal cycli	Okklusion påvist	Okklusion ikke påvist	Okklusion delvise cycli der ikke medtages	
22/10-2013	1.venstre gangben	Store mek	22,5	1	1	20	20	0	0	
23/10-2013	1.højre gangben	Lille mek	15	0,6	1	2	2	0	2	
23/10-2013	2.højre gangben	store mek	12,5	1,7	1,7	2	2	0	1	
24/10-2013	2.venstre gangben	stor mek	40	1,15	1,2	4	4	0	2	
24/10-2013	venstre klo	Store mek	42,5	1,5	1,6	7	7	0	4	

Hummer 3, 620 gram,										
Dato	Organ	Nervetype	Funktionel længde	Tærskel værdi, V	Mindste stimulus- strøm, V	Antal cycli	Okklusion påvist	Okklusion ikke på- vist	Okklusion delvise cycli der ikke medtages	
28/10- 2013	Højre klo	Sensorisk	12,5	1	1	1	1	0	0	
28/10- 2013	1. venstre gangben	Lille bundt	17,5	0,7	0,7	2	2	0	0	
28/10- 2013	1.højre gangben	store mek	22,5	1	1	4	4	0	1	
29/10- 2013	Venstre klo	Sensorisk	72,5	< 1	1	20	20	0	2	
29/10- 2013	Venstre klo	Lille bundt	20	1	1	5	5	0	6	
30/10- 2013	2.højre gangben	Lille bundt	15	0,7	0,85	10	10	0	1	
Hummer 4, 660 gram,										
Dato	Organ	Nervetype	Funktionel længde	Tærskel værdi, V	Mindste stimulus- strøm, V	Antal cycli	Okklusion påvist	Okklusion ikke på- vist	Okklusion delvise cycli der ikke medtages	
13/01- 2014	1. venstre gangben	Lille bundt	15	2	3	10	10	0	0	

Regnorm										
Dato	Funktionel længde (mm)	Tærskel(V) hoved med	Tærskel(V), hale,med	Tærskel(v) hoved lat	Tærskel(V) hale lat	tærskel(v) hale lat	Kollisions strøm (V)	Okklusion påvist	passage påvist	
17/09- 2013	22,5	0,3	0,31	0,4	0,35	0,33	0,33	5	0	
24/09- 2013	ikke målt	0,55	0,7	0,55	0,7	0,55	0,55	5	5	
25/09- 2013	22,5	0,13	0,21	>1	0,53	0,6	0,6	5	11	
06/10- 2013	22,5	0,3	0,31	>5	0,35	0,4	0,4	20	3	
15/12- 2013	47,5	1	1	>5	>5	1,4	1,4	2	1	
17/12- 2013	20	0,3	0,3	0,35	0,4	0,3	0,3	20	3	
17/01- 2014	37,5	0,55	1,5	2	0,55	0,6	0,6	12	8	

## B Nervekammeret



## C Hardware og software

<b>Bio Amp Input – Inputs 3 &amp; 4 (PowerLab 15T &amp; 26T)</b>	
Number of channels:	2
Input configuration:	Differential with common isolated ground
Amplification ranges:	$\pm 20$ mV $\pm 10$ mV $\pm 5$ mV $\pm 2$ mV $\pm 1$ mV $\pm 500$ $\mu$ V $\pm 200$ $\mu$ V $\pm 100$ $\mu$ V
Gain accuracy:	1 %
Non-linearity:	1 %
Noise:	$< 1 \mu\text{V}_{\text{rms}}$ (0.5 – 2 kHz)
Maximum input over-voltage:	$\pm 5$ V
Input leakage current:	$< 4 \mu\text{A}_{\text{rms}}$ @ 120 V, 60 Hz $< 4 \mu\text{A}_{\text{rms}}$ @ 240 V, 50 Hz
DC blocking:	$\pm 0.3$ V
Baseline restoration:	Automatic or user-controlled
Input impedance:	100 M $\Omega$ @ to isolated ground ( $\sim 500$ pF per lead) using supplied Bio Amp subject cable and lead wires
Safety:	IEC60601-1 and CSA/UL approval pending
Isolation rating:	400 V AC <sub>rms</sub> (1 minute)
MRR:	130 dB
CMRR:	110 dB
Filters - High pass:	Single pole 0.5 Hz and 10 Hz
- Low pass:	10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 Hz
- Notch:	Mains

For yderligere oplysning se:

<http://www.adinstruments.com/content/teaching-series-15t-26t-226-426>  
samt  
<http://www.adinstruments.com/products/labchart>

## Litteratur

- [1] B. C. Abbott, A. V. Hill, and J. V. Howarth. The positive and negative heat production associated with a nerve impulse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 148(931):pp. 149–187, 1958.
- [2] Revathi Appali, Benny Lautrup, Thomas Heimburg, and Ursula van Rienen. Soliton collision in biomembranes and nerves - A stability study. In Bastiaan Michielsen and Jean-René Poirier, editors, *Scientific Computing in Electrical Engineering SCEE 2010, Mathematics in Industry 16*, pages 205–212. Springer, Berlin Heidelberg, 1 edition, 2012.
- [3] Revathi Appali, Ursula van Rienen, and Thomas Heimburg. A Comparison of the Hodgkin–Huxley Model and the Soliton Theory for the Action Potential in Nerves. In Aleš Iglíč, editor, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, volume 16, chapter 9, pages 275–299. Elsevier, 2012.
- [4] Stewart C. Birse and George D. Bittner. Regeneration of giant axons in earthworms. *Brain Research*, 113(3):575–581, 1976.
- [5] Andreas Blicher and Thomas Heimburg. Voltage-Gated Lipid Ion Channels. *PloS one*, 8(6):e65707, January 2013.
- [6] P Brink and L Barr. The resistance of the septum of the median giant axon of the earthworm. *The Journal of general physiology*, 69(5):517–36, May 1977.
- [7] P Brink and M M Dewey. Nexal membrane permeability to anions. *The Journal of general physiology*, 72(1):67–86, July 1978.
- [8] G R Christoffersen and L A Miller. Two types of excitatory activity recorded from the median giant fiber of the earthworm. *Acta physiologica Scandinavica*, 87(3):425–7, March 1973.
- [9] Richard E. Coggeshall. A fine structural analysis of the ventral nerve cord and associated sheath of *Lumbricus terrestris* L. *The Journal of Comparative Neurology*, 125(3):393–437, December 1965.
- [10] Dr. Anton Collin. *Criodrilus lacuum* Hoffm. *Zeitschrift für wissensch. Zoologie*, 46:471–497, 1880.
- [11] J C DALTON. Effects of external ions on membrane potentials of a lobster giant axon. *The Journal of general physiology*, 41(3):529–42, January 1958.

- [12] Brecknell M. Dierolf and Peter R. Brink. Effects of thermal acclimation on cable constants of the earthworm median giant axon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 44(2):401–406, 1973.
- [13] W W DOUGLAS and J M RITCHIE. A technique for recording functional activity in specific groups of medullated and non-medullated fibres in whole nerve trunks. *The Journal of physiology*, 138(1):19–30, August 1957.
- [14] J.C. Eccles, R Granit, and J. Z. Young. Impulsis in the giant nerve fibres of earthworms. *J. Physiol*, 77:23–25, 1932.
- [15] Benedict Friedländer. Über die Regeneration herausgechnittener Theile des Centralnervensystem von Regenwürmern. *Zeitschrift für wissenschaft. Zoologie*, 60:249–283, 1895.
- [16] C K Govind. Muscles and their innervation. In Jan Robert Factor, editor, *BIOLOGY OF THE LOBSTER homarus americanus*, chapter 12, pages 291–313. Academic Press, 1. edition, 1995.
- [17] J Günther. Neuronal syncytia in the giant fibres of earthworms. *Journal of neurocytology*, 4(1):55–62, February 1975.
- [18] J Günther. Impulse conduction in the myelinated giant fibers of the earthworm. Structure and function of the dorsal nodes in the median giant fiber. *The Journal of comparative neurology*, 168(4):505–31, August 1976.
- [19] T Heimburg. Lipid ion channels. *Biophysical chemistry*, 150(1-3):2–22, August 2010.
- [20] A L HODGKIN and A F HUXLEY. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4):500–44, August 1952.
- [21] Hanns Christian Hopf. Untersuchungen über die Unterschiede in der Leitungsgeschwindigkeit motorischer Nervenfasern beim Menschen. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde*, 183(6), 1962.
- [22] F J JULIAN and D E GOLDMAN. The effects of mechanical stimulation on some electrical properties of axons. *The Journal of general physiology*, 46:297–313, November 1962.
- [23] C.Y Kao. Basis for After-Discharge in the Median Giant Axon of the Earthworm. *Science, New Series*, 123(3201):11–12, 1956.
- [24] R W Kensler, P R Brink, and M M Dewey. The septum of the lateral axon of the earthworm: a thin section and freeze-fracture study. *Journal of neurocytology*, 8(5):565–90, October 1979.



- [25] Nikolay Kladt, Ulrike Hanslik, and Hans-Georg Heinzel. Teaching basic neurophysiology using intact earthworms. *Journal of undergraduate neuroscience education : JUNE : a publication of FUN, Faculty for Undergraduate Neuroscience*, 9(1):A20–35, January 2010.
- [26] E A KRAVITZ, S W KUFFLER, and D D POTTER. GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID AND OTHER BLOCKING COMPOUNDS IN CRUSTACEA. III. THEIR RELATIVE CONCENTRATIONS IN SEPARATED MOTOR AND INHIBITORY AXONS. *Journal of neurophysiology*, 26:739–51, September 1963.
- [27] E A KRAVITZ, S W KUFFLER, D D POTTER, and N M VANGELDER. GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID AND OTHER BLOCKING COMPOUNDS IN CRUSTACEA. II. PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM. *Journal of neurophysiology*, 26:729–38, September 1963.
- [28] B Lautrup, R Appali, A D Jackson, and T Heimburg. The stability of solitons in biomembranes and nerves. *The European physical journal. E, Soft matter*, 34(6):1–9, June 2011.
- [29] J W Lichstein, M L Ballinger, A R Blanchette, H M Fishman, and G D Bittner. Structural changes at cut ends of earthworm giant axons in the interval between dye barrier formation and neuritic outgrowth. *The Journal of comparative neurology*, 416(2):143–57, January 2000.
- [30] Alvin W. Lyckman and George D. Bittner. Axonal conduction and electrical coupling in regenerating earthworm giant axons. *Experimental Neurology*, 117(3):299–306, 1992.
- [31] Alvin W. Lyckman, S M Heidelbaugh, and G D Bittner. Analysis of neuritic outgrowth from severed giant axons in *Lumbricus terrestris*. *The Journal of comparative neurology*, 318(4):426–38, April 1992.
- [32] P.J Mill. Recent developments in earthworm neurobiology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 73(4):641–661, January 1982.
- [33] Brian Mulloney. Structure of the Giant Fibers of Earthworms. *Science, New Series*, 168(3934):994–996, 1970.
- [34] Nicol, J. A. Colin . THE GIANT AXONS OF ANNELIDS. *The Quarterly Review of Biology*, 23(4):291–323, 1948.
- [35] Doris Oesterle and Friedrich G. Barth. Dorsal giant fibre septum of earthworm. Fine structural details and further evidence for gap junctions. *Tissue and Cell*, 13(1):9–18, 1981.

- [36] R . A Pax and C. D. Drewes. NEUROMUSCULAR PHYSIOLOGY OF THE LONGITUDINAL MUSCLE OF THE EARTHWORM , LUMBRI-CUS TERRESTRIS. *Journal of Experimental Biology.*, 60:445–452, 1974.
- [37] J M Ritchie and R D Keynes. The production and absorption of heat associated with electrical activity in nerve and electric organ. *Quarterly reviews of biophysics*, 18(4):451–76, November 1985.
- [38] W. A. H. Rushton. Action Potentials from the Isolated Nerve Cord of the Earthworm. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 132(869):423–437, April 1945.
- [39] R G Sherman and H L Atwood. Structure and neuromuscular physiology of a newly discovered muscle in the walking legs of the lobster *Homarus americanus*. *The Journal of experimental zoology*, 176(4):461–74, April 1971.
- [40] Kazumichi Shimizu and Mark Stopfer. Gap junctions. *Current Biology*, 23(23):R1026–R1031, 2013.
- [41] Howard Brown Stough. Giant nerve fibers of the earthworm. *The Journal of Comparative Neurology*, 40(3):409–463, June 1926.
- [42] Howard Brown Stough. Polarization of the giant nerve fibers of the earthworm. *The Journal of Comparative Neurology*, 50(1):217–229, June 1930.
- [43] I Tasaki and K Iwasa. Rapid pressure changes and surface displacements in the squid giant axon associated with production of action potentials. *The Japanese journal of physiology*, 32(1):69–81, January 1982.
- [44] Ichiji Tasaki. Collision of two nerve impulses in the nerve fibre. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3:494–497, 1949.
- [45] Edgar Villagran Vargas, Andrei Ludu, Reinhold Hustert, Peter Gumrich, Andrew D Jackson, and Thomas Heimburg. Periodic solutions and refractory periods in the soliton theory for nerves and the locust femoral nerve. *Biophysical chemistry*, 153(2-3):159–67, January 2011.
- [46] W. Wales, F. Clarac, M. R. Dando, and M. S. Laverack. Innervation of the receptors present at the various joints of the pereopods and third maxilliped of *Homarus gammarus* (L.) and other macruran decapods (crustacea). *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 68(4):345–384, December 1970.
- [47] Theodore J. Wiens. The inhibitory innervation of the walking leg of the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 167(1), May 1990.

- [48] C.A.G. Wiersma. On the Innervation of the Muscles in the Leg of the Lobster, *Homarus Vulgaris* Milne Edwards. *Archives Néerlandaises de Zoologie*, 8:384 –392, 1951.
- [49] C.A.G Wiersma and S.H. Ripley. Innervation Patterns of crustacean Limbs. *Physiol Comp Oecol*, 2:391 –405, 1952.
- [50] Wen Hui Wu and Robin L Cooper. Physiological recordings of high and low output NMJs on the crayfish leg extensor muscle. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 1(45):e2319, January 2010.