UPPSALA
UNIVERSITET

# Finns det ett samband mellan *beta* -Metylamino-L-alanin (BMAA) och utveckling av Alzheimers?

Ruth Ayele Nigatu

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

# Finns det ett samband mellan exponering för *beta*-Methylamino-L-alanin (BMAA) och utveckling av Alzheimers?

**Ruth Ayele Nigatu**

Självständigt arbete i biologi 2016

## Sammandrag

*Beta*-Metylamino-L-alanin (BMAA) är en icke-proteinogen (kodas inte naturligt) aminosyra som tros produceras av cyanobakterier, kiselalger och dinoflagellater. Det var först i slutet av 1990 talet då det misstänktes ha neurotoxiska egenskaper. Vid denna tid upptäckte Paul Alan Cox (en etnobotanist) tillsammans med sina kollegor under en resa till Stillahavsön Guam för att det hade förekommit hög incidens av sjukdomen amyotrofisk lateral skleros-parkinsonism-demens (ALS-PDC) bland Chamorro-folket på ön. När de började undersöka, observerade de att sjukdomen dominerande i några avlägsna byar, och inga tydliga tecken på att sjukdomen var ärftlig kunde observeras. När de fortsatte att fokusera på miljöfaktorer, upptäckte de att kottepalmfrön som öborna använde för att göra mjöl innehöll BMAA. De upptäckte också att flyghundarna (stora fladdermöss) som konsumerades av Chamorro-folket också åt dessa frön. Detta väckte då intresset hos forskare att undersöka huruvida andra neurodegenerativa sjukdomar såsom Alzheimers kan orsakas av aminosyran. Denna litteraturstudie syftar på att få reda på om det finns ett samband mellan utveckling av Alzheimers för exponering för BMAA.

Forskning har uppvisat att BMAA har kunnat leda till ansamling av amyloida plack och neurofibrillära härvor (två onormala strukturer som utvecklas hos Alzheimerspatienter) hos gröna markattor som hade tilldelats BMAA oralt i 140 dagar. BMAA har dessutom upptäckts i hjärnor av patienter som hade dött av neurodegenerativa sjukdomar. Ytterligare så har man hittat BMAA i cyanobakterier, kottepalm frön och flyghundar. Man har även observerat att koncentration av BMAA ökar desto högre upp man mäter i näringskedjan. Man har även inkuberat celler i en lösning med radioaktivt BMAA ($^3$H-BMAA) med medier som varit fattiga på aminosyror. I detta fall har BMAA visat sig ha förmågan att inkorporeras i humant protein i frånvaron av aminosyran serin. Detta tros då leda till en felaktighet i funktionen och veckning av proteiner.

Det finns inte tillräckligt med data för att hävda eller utesluta BMAA som en riskfaktor för just Alzheimers. Detta beror på att sambandet mellan BMAA och Alzheimers (liksom andra neurodegenerativa sjukdomar) fortfarande är i ett tidigt skede av forskning. Den mesta forskningen som gjorts idag fokuserar på BMAA och allmänna strukturer som neurodegenerativa sjukdomar har gemensamt. Det finns en väldigt begränsad mängd forskning/data på en specifik koppling mellan Alzheimers och BMAA. Vad som ändå går att säga med säkerhet är att BMAA har visat sig ha förmågan att leda till utvecklingen av plack och härvor vilket är vad man observerar i hjärnan under Alzheimers. För att med säkerhet hävda BMAA kan leda till utvecklingen av Alzheimers krävs det att framtida studier fokuseras på just Alzheimers.

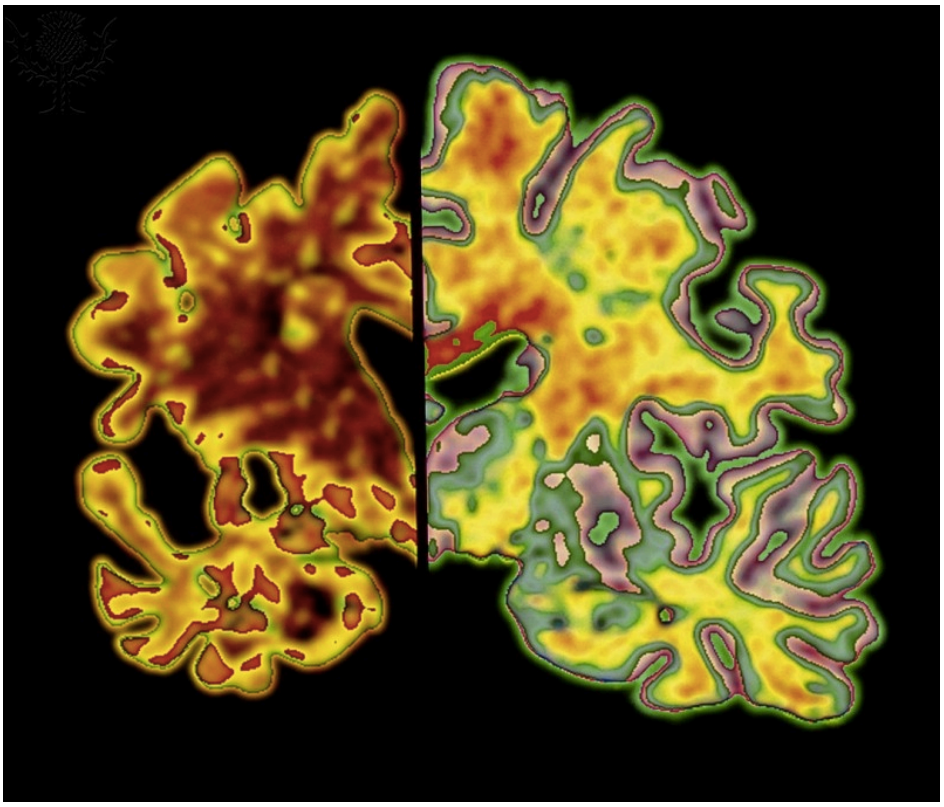
## Inledning

Alzheimers är en neurodegenerativ sjukdom som är den vanligaste formen av demens hos äldre (Jonsson *et al*. 2013). Den kännetecknas av långsam och gradvis förlust av kognitiva funktioner och en rad olika symptom (Bird 2008). De tidiga tecknen på sjukdomen är försämrat minne som oftast är subtila och därmed svårupptäckta. Dessutom uppvisar patienter

ofta förvirring, dåligt omdöme, agitation, hallucinationer och språkstörningar (Bird 2008). Risken att utveckla sjukdomen ökar med stigande ålder och (utvecklas oftast efter 65 års ålder) (Bird 2008). Den kliniska varaktigheten av sjukdomen är vanligen 8-10 år men kan variera från 1-25år.

Alzheimers är kliniskt diagnostiserad baserat på tecken på långsamt fortskridande demens där individerna presenteras med frågor om de senaste händelserna i deras liv, liksom gamla. Dessutom kan den också diagnostiseras genom neuroradiologi där man försöker hitta brutto cerebral kortikal atrofi (progressiv förlust av hjärnceller). Dessa sätt att kliniskt diagnostisera sjukdomen är dock bara korrekt 80-90% av tiden. Obduktionsundersökning är det bästa sättet att fastställa neuropatologiska fynd för att diagnostisera Alzheimers med 100% säkerhet (Bird 2008). Det som är problematiskt med denna är att det går bara att göra efter att patienten har dött då det är för sent.

En av de onormala strukturer som utvecklas i hjärnan under Alzheimers är beta-amyloid plack. Detta bildas som ett resultat av att proteinet "amyloid precursor protein" (APP) klyvs på ett felaktigt sätt vilket resulterar i en överproduktion av peptiden beta-amyloid (Tariot & Fedoroff 2003). Den andra typen av onormal struktur som utvecklas i hjärnan är ”neurofibrillary tangles” (NFT). Utöver dessa onormala strukturer som utvecklas, verkar hjärnorna hos individer med Alzheimers också minska i storlek (Figur 1).



**Figur 1.** Hjärnskiva av en Alzheimer patient (vänster) jämfört med en normal hjärna (höger). Hjärnan med Alzheimers sjukdom har krympt i storlek på grund av degenerering och död av nervceller *(Encyclopædia Britannica ImageQuest*. Hämtad 2016-05-18, från http://quest.eb.com/search/132_1264786/1/132_1264786).

Avsaknaden av ett test som kan användas på levande patienter försvårar i hög grad forskningsinsatser på sjukdomsmekanismer och är ett särskilt problem för kliniska prövningar (Bird 2008). Behandlingar kan inte heller utvärderas korrekt om de måste administreras innan

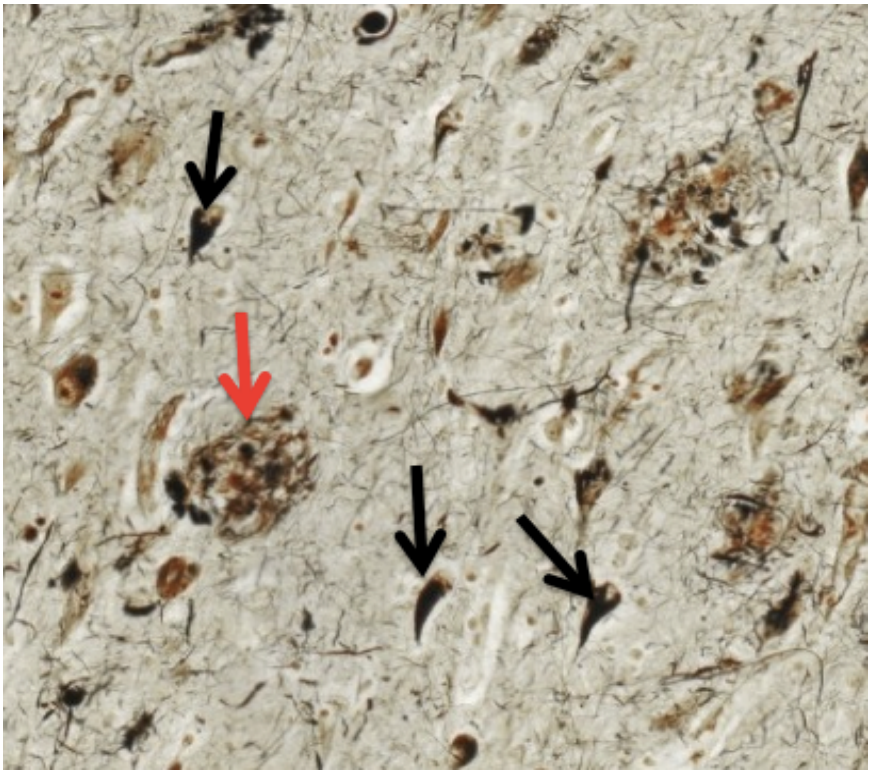
sjukdomen fortskrider förbi ett visst stadium, särskilt om skedet är oklart (Murphy *et al*. 2010).

Syftet med denna litteraturstudie är att redogöra för sambanden mellan exponering av BMAA och utveckling av Alzheimers. För att göra detta så kommer data från undersökningar sammanfattas och användas för att besvara frågeställningen. Innan redovisning av resultaten så ges en kort introduktion till BMAA samt dess produktion/roll i naturen och hur/när vi människor kommer i kontakt med den.

**Vad är orsaken till Alzheimers?**

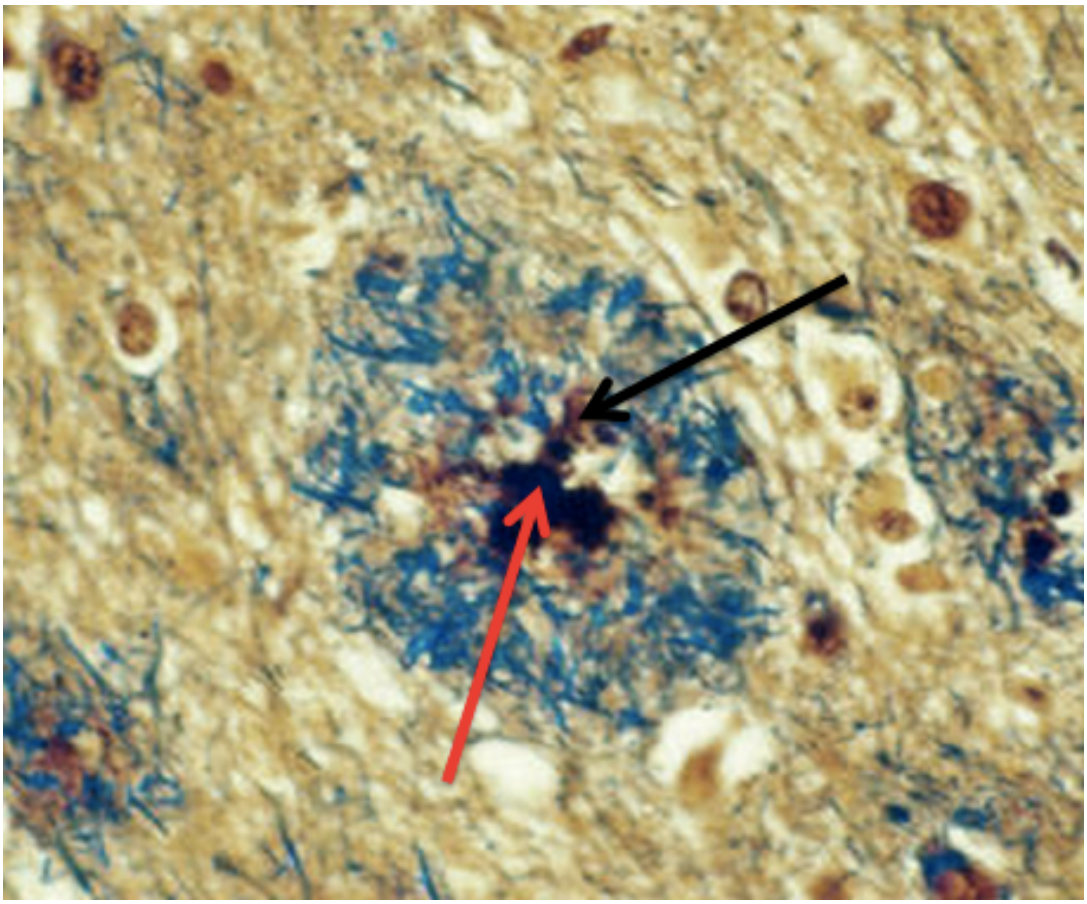
*Proteinet Tau*

Även om den exakta orsaken till Alzheimers inte är känt, finns det många hypoteser som tyder på att den har både genetiska och miljömässiga orsaker. Bland dessa är proteinet tau som naturligt förekommer i hjärnan (Brister *et al*. 2014). Detta protein förekommer i både fosforylerad och icke-fosforylerad form. Hos Alzheimers patienter tros detta protein vara fosforylerat på ett felaktigt sätt vilket leder till bildandet av NFT (Tariot & Federoff 2003). Vad som leder till detta är att tau i normalfallet binder till mikrotubuli men i detta fall binder den till sig själv. Den struktur som bildas när tau binder till dess egen struktur är känd som parade spiralformade filament och är grunden för NFT (Daebel *et al*. 2012) (Figur 2). I vissa Alzheimerspatienter har man påvisat ansamling av NFT och inga amyloida plack. På grund av detta föreslår några forskare att ansamling av felfosoforylerat tau leder till uppbyggnad av NFT som orsakar sjukdom (Blennow *et al*.1996). I andra fall tyder forskning på att NFT är vad som leder till överproduktion av beta-amyloid (Tariot & Federoff 2003). Detta beror på att NFT i stort sett är en produkt av fosforylerat tau-protein, som sedan ökar mängden felforsforylerat tau i hjärnan och därmed uppbyggnaden av NFT. Detta leder i sin tur till att neurologiska funktioner i hjärnan påverkas negativt.



**Figur 2.** Hjärnvävnad från patient med Alzheimers sjukdom. Två karakteristiska särdrag hos Alzheimers sjukdom ses här; neurofibrillära härvor (svarta pilar) och amyloid plack (röd pil) *(Encyclopædia Britannica ImageQuest*. Hämtad 2016-05-18, frånhttp://quest.eb.com/search/132_1259323/1/132_1259323).

*Proteinet Beta-Amyloid*
Som tidigare nämnt, är beta amyloid ett protein som ofta förknippas med Alzheimers. När proteinet APP klyvs på ett felaktigt sätt resulterar det i en överproduktion av peptiden beta amyloid 1-42 (Li *et al*. 2016). Denna produktion av proteinet är i allmänhet endast närvarande mellan neuroner. Proteinet fälls ut i hjärnan (på grund av överproduktionen) och bildar peptider, som är vad man kallar för amyloid plack (Figur 3). Det slutar inte där; överproduktion av beta-amyloid leder i sin tur till andra förändringar (neurologiska) såsom uppbyggnaden av NFT.



**Figur 3.** Hjärnvävnad från en död Alzheimers patient som visar amyloid plack (det bruna; svart pil) som bildats mellan neuronerna. Man kan även se en kärna (röd pil) som består av proteinet beta-amyloid i mitten av placket *(Encyclopædia Britannica ImageQuest*. Hämtad 2016-05-18, från http://quest.eb.com/search/139_ 1921038/1/139 _1921038).

Det är ett samspel mellan dessa två abnorma strukturer (NFT och plack) som leder till blockering av signaler mellan nervceller i hjärnan (Tariot & Federoff 2003). Denna blockering leder sedan till celldöd. Mekanismerna bakom celldöden är dock ännu inte förstådda. Det enda som är känt är att APP klyvs av α-, β- och γ-sekretas som är proteolytiska enzymer (enzymer som bryter ner proteiner till mindre peptider/aminosyror). Det som händer under Alzheimers sjukdom är att dessa enzymers förlorar förmågan att klyva APP korrekt (Li *et al*. 2016). Detta är vad som leder till beta-amyloid produceras i överskott.

*ApoE*
När det gäller de genetiska aspekterna av Alzheimers, är ApoE-genen den som är vetenskapligt accepterad att vara associerad som en riskfaktor för sjukdomen (Green *et al*. 2009, Castellano *et al*. 2011). Denna riskfaktor är ansvarig för produktionen av proteinet apolipoprotein E. som är en kolesterol bärare i hjärnan vilket hjälper i lagring av amyloid och

rensning av insättningar från parenkymet i hjärnan (Igbavboa *et al*. 2009). I avsaknad av funktion av denna gen förkommer en överdriven avlagring av beta-amyloid förekommer i hjärnan. Det finns olika former (eller alleler) av ApoE, men de tre vanligaste är APOE ε2, APOE ε3 och APOE ε4 (Green *et al*. 2009). ApoE ε4 förekommer i ca 25-30% av befolkningen och i cirka 40 % av alla människor med Alzheimers (Green *et al*. 2009). Personer som utvecklar Alzheimers sjukdom är mer benägna att ha en ApoE ε4 allel än människor som inte utvecklar sjukdomen. ApoE ε4 kallas riskfaktorgenen eftersom det ökar en persons risk att utveckla sjukdomen; men att man ärvt en ApoE ε4 allel betyder dock inte att en person definitivt kommer att utveckla Alzheimers sjukdom (Green *et al*. 2009).

*Miljöfaktorer*
Man har ännu inte kunnat påvisa miljöfaktorer som, huvudtrauma, virus, toxiner eller låg utbildningsnivå som en direkt orsak till utveckling av Alzheimer (Bird 2008). Den enda spekulationer som finns mellan miljöfaktorer och Alzheimers är att de har förmågan att verka på en predisponerande genetisk bakgrund (Borenstein *et al*. 2006). Genom tvillings studier så har man kunnat indikera både gener och miljöfaktorer (som utbildning, engagerad livsstil i medelåldern, kort vuxen höjd, och föräldrars samhällsklass) (Gatz 2006).

**BMAA**
I slutet av 1990 talet, reste Paul Alan Cox (en etnobotanist) och hans kollegor till öarna i Stilla havet i Guam (Holtcamp 2012). De gjorde detta för att intervjua Chamorro-folket som led av en sjukdom som var lik Parkinson, ALS och Alzheimers sjukdom. Dr. Leonard Kurland, en neurolog, märkte vid den tidpunkten att sjukdomen var dominerande i några avlägsna byar och man kunde inte tydligt observera ett tecken på ärftlighet. Forskarna började sedan undersöka fler miljöfaktorer som bara invånarna i Chamorro exponerats för på ön. De upptäckte senare att dessa människor använde kottepalm frön för att göra mjöl för tortillas och att dessa i sin tur innehöll neurotoxinet BMAA (Holtcamp 2012). Ytterligare forskning gjordes för att indikera detta neurotoxin som en orsak till sjukdomen, vilket ledde till att de upptäckte att det också var närvarande i cyanobakterier som förekommer i skadliga algblomningar.

Neurotoxinet BMAA är en icke proteinogen aminosyra som är en strukturell analog av den naturligt förkommande aminosyran alanin (Dunlop *et al*. 2013). BMAA förekommer finns i både icke-proteinbundet och proteinbunden form. I naturen så produceras den naturligt av kiselalger, dinoflagellater och cyanobakterier (Rosén *et al*. 2016). Dessa organismer förekommer i stora mängder i naturen och förekommer i nästan alla vatten- och marksystem. Som helhet spelar dem en nyckelroll i den globala koldioxidfixering samt kisel reglering (Bidle *et al*. 2002). Tillsammans med växter, är dessa organismer primärproducenter som på något sätt upprätthåller näringsväven. BMAA som produceras av dessa har då möjlighet att överföras och bio-magnificeras genom trofisk nivån. Därmed ökar hälsorisken som orsakas av dess neurotoxiska potential.

*BMAA och dess isomerer*
BMAA isolerades först från kottepalm frön 1967 (Holtcamp 2012), Den är en icke-proteinaminosyra med en sekundär amin på sidokedjan. Dens monohydroklorid, är en vitt fast salt som är lösligt i vatten. BMAA innehåller en karboxylgrupp, sekundär amin bunden till β-kol, och en primär amin bunden till α-kol (Holtcamp 2012),

Största utmaningen i BMAA analys (genom mas spektrometri) förekomsten av dess strukturella isomerer i ett prov. Det behövs eftersom de strukturella isomererna delar samma

molekylvikt med BMAA (118g/mol). Den första isomeren som upptäcktes i prover under BMAA analys var α-γ-diamino butyricsyra (DAB) (Rosén 2008) vilket är en växt neurotoxin. Senare upptäcktes ytterligare två andra isomerer; β-amino-N-metylalanin (BAMA) och N-(2-aminoethy)glycin (AEG) i naturliga prov (Banack *et al*. 2012, Jiang 2012). Inom forskningen riktat på BMAA och neurodegenerativa sjukdomar så brukar man inte särskilja mellan BMAA och dess isomerer när man rapporterat att man hittat det i prov. Detta då det oftast krävs att man använder sig av avancerade analytiska metoder.

Det finns inget fast bevis som stöder hypotesen att BMAA kan framställas genom cyanobakterier, men mycket forskning har varit inriktad mot att förstå vilken roll aminosyran spelar i organismerna. Man misstänker att i kottepalm frö, kan den tjäna som en anti herbivori förening liksom för kväve lagring (Cox *et al*. 2003). Forskning har väckt förslag om att BMAA syntetiseras/produceras som ett resultat av katabolism som svar på kväve brist. I både icke-kvävefixerande och kvävefixerande cyanobakterier, har det rapporterats att BMAA kan leda till tillväxthämning och induktion av kloros (otillräcklig produktion av klorofyll) (Berntzon *et al*. 2013). Det föreslogs först att BMAA fungerar som en hämmare av kväve fixering genom att avaktivera nitrogenas (det enzym som är involverat i produktionen) (Berntzon *et al*. 2013). Senare föreslogs det att det fanns en länk till försämrad biosyntes av glutamat och nedbrytning på grund av att oxidativ stress (Berntzon *et al*. 2013).

## Studier: Länk mellan BMAA och neurodegenerativa sjukdomar

### Kvantifiering av BMAA i fisk och skaldjur

En studie från 2014 utfördes av forskare vid Stockholms universitet vid sidan av Livsmedelsverket (Jiang *et al*. 2014) försökte avgöra mängden BMAA som var närvarande i fisk och skaldjur i den svenska marknaden. De använde analysmetoder (Ultra-High perfomance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) för att uppskatta hur mycket BMAA en individ kan utsättas för genom konsumtion av fisk och skaldjur. För att göra detta fokuserade de på de fem mest konsumerade fiskarterna (strömming, abborre, röding, lax och torsk), blötdjur (ostron och blåmusslan) samt kräftdjur (kräftor och räkor). Dessa erhölls från två populära lokala marknader och fem vanliga stormarknader i centrala Stockholm. För att minska risken för kontaminering och använde de råa och färska skaldjur. Mängden BMAA som upptäcktes kan man se i tabell 1 nedan. De erhållna värdena för BMAA varierade från 0,01 till 0,90 $\mu g^{-1} g^{-1}$ men var inte detekterbar i abborre, lax, torsk och kräftor. Det finns inte mycket som kan göras med att bara veta mängderna som finns i dessa arter eftersom att det måste finnas en förståelse för vilka doser som utlöser en negativ effekt och är närvarande under Alzheimers.

**Tabell 1.** Koncentrationen *beta* -Metylamino-L-alanin (BMAA) ($\mu g^{-1} g^{-1}$) som hittats i fem fiskarter (strömming, abborre, röding, lax och torsk), två blötdjur (ostron och blåmusslan) samt två kräftdjur (kräftor och räkor). ND står för "non-detectable" då man med metoden som använts inte kunnat hitta BMAA i arterna.

| **Art** | **Koncentration** ($\mu g^{-1} g^{-1}$) |
|---|---|
| Ostron | 0,10 – 0,66 |
| Räka | 0,11 – 0,46 |
| Blåmussla | 0,08 – 0,90 |
| Strömming | ND – 0,02 |
| Röding | ND – 0,01 |
| Abborre | ND |
| Lax | ND |
| Torsk | ND |
| Kräfta | ND |

**Intag av BMAA via kosten**

För att få reda på i vilka doser BMAA utlöser neuropati utförde Cox och hans kollegor (2016) en studie där de försökte finna sambandet mellan BMAA och utvecklingen av NFT och plack. För att göra detta kompletterade de gröna markattors låg-protein diet med L-BMAA. I första experimentet, så fick 16 unga individer en frukt doserad med 210 mg $kg^{-1}$ $d^{-1}$ av BMAA. En kohort av fyra matades en bit frukt som innehöll 61 mg av L-BMAA dagligen under 140 dagar. Den andra kohorten fick frukt med 651 mg L-serin. Den tredje kohorten matades frukt innehållande samma mängd av L- BMAA samt 651mg av L-serin. Den fjärde kohorten (som var kontrollgruppen) gavs frukt endast doserad med rismjöl som en placebo.

Samma experiment upprepades, men denna gång med vuxna markattor. Den här gången bestod kohorten av åtta individer och eftersom att markattorna var större i storlek jämfört med de unga så justerades dosen. Den här gången var doserna som administrerades till respektive kohort; 987mg L-BMAA, L-serin eller rismjöl. Den första kohorten administrerades 987mg L-BMAA, den andra gruppen 98,7mg L-BMAA, den tredje kohort 987mg L-BMAA och 987mg L-serin och fjärde; 987mg av rismjöl. Två kohorter administrerades L-BMAA i detta fall för att forskarna ville göra exponeringen så nära det verkliga exponering av Chamorro-folket, som var omkring 21 mg $kg^{-1}d^{-1}$. Under loppet av experimenten, var blodserum och cerebral spinalvätska tagen. Detta gjordes för att se till att individerna som tilldelades L-BMAA och L-serin var i själva verket utsatta för det och att dessa var frånvarande i placebogruppen. Efter experimentet, 14 regioner i markattornas hjärna färjades med hjälp av immunohistologiska tekniker för att undersöka neuropatologin. Resultaten för det första experimentet med de unga visade att det fanns en ansamling av både plack och härvor i hjärnan hos de individer som administrerades L-BMAA. Kohorten som fick L-serin och kontrollerna var i allmänhet negativa för tau och β-amyloid neuropatologi. Vidare observerades det att kohorten som administrerades lika mängder av L-serin och L-BMAA hade en 80-90% av NFT och amyloida plack. I replikaten med vuxna fanns hyperfosforylerade tau insättningar och bildandet av NFT i alla individer som utfodrats med L-BMAA (98,7 mg och 987 mg). Det rapporterades även ett samband mellan dos och densitet av NFT i hjärnan. En högre dos av L-BMAA resulterade i en fördubbling av tätheten av den lägre dosen. Komplettering av kosten med L-serin resulterade i mer än

50% minskning av NFT i fem av de 14 regionerna som undersöktes. Forskaren drog slutsatsen att kronisk exponering via kosten för L-BMAA resulterar i bildandet av NFT och amyloid plack, och att det finns ett tydligt samband med dos. De föreslog även också att L - serin potentiellt skulle kunna användas som behandling för att minska utvecklingen av Alzheimers såväl som i andra neurodegenerativa sjukdomar.

**BMAA i hjärnvävnad**

Istället för att utföra en orsak- och- verkan experiment så använde forskare sig av hjärnskivor från patienter som hade dött av neurodegenerativa störningar och testad för BMAA närvaro. BMAA har detekterats i hjärnvävnader från kanadensiska patienter som hade dött av Alzheimers, medan det inte fann någon BMAA i kontrollgruppen utan neurologiska sjukdomar (Banack *et al*. 2010). Detta var återigen bekräftat när en medelkoncentration av 214 $\mu g^{-1}g^{-1}$ BMAA hittades i patienter med Alzheimers sjukdom (Banack *et al*. 2010). Dessutom upptäcktes en genomsnittlig koncentration av 268 $\mu g^{-1}g^{-1}$ BMAA i patienter som hade dött av ALS medan ingen BMAA upptäcktes i patienter med Huntingtons som även är en neurodegenerativ sjukdom. Huntingtons är enbart en genetisk neurodegenerativ sjukdom vilket innebär att ytterligare faktor spelar en försumbar (om någon) roll i dess utveckling (Banack *et al*. 2010). Vad detta sedan föreslår är att BMAA är det som leder till neuropatologi och är inte en biprodukt av den neurodegeneration som inträffar (Bradley & Mash 2009).

En forskargrupp (Snyder *et al* . 2009) har dock rapporterat att de inte kunde upptäcka BMAA i hjärnan hos patienter med Alzheimers sjukdom och Guam ALS-PDC. De påpekade också att BMAA inte orsakar patologi, en neurodegenerativ sjukdom i möss inom deras modellsystem. Denna studie kritiserades dock för att ha använt sig av metoder, där proteinbundna BMAA inte hade redovisats. Dessutom är det en hypotes att musmodell inte är passande att undersöka neurotoxiciteten av BMAA (Karamyan & Speth 2008). Trots dessa negativa fynd, alla *in vivo*-studier indikerade neurotoxiciteten av BMAA samt en förening med störd motorisk funktion (Karamyan & Speth 2008 ).

**Biomagnifiering av BMAA**

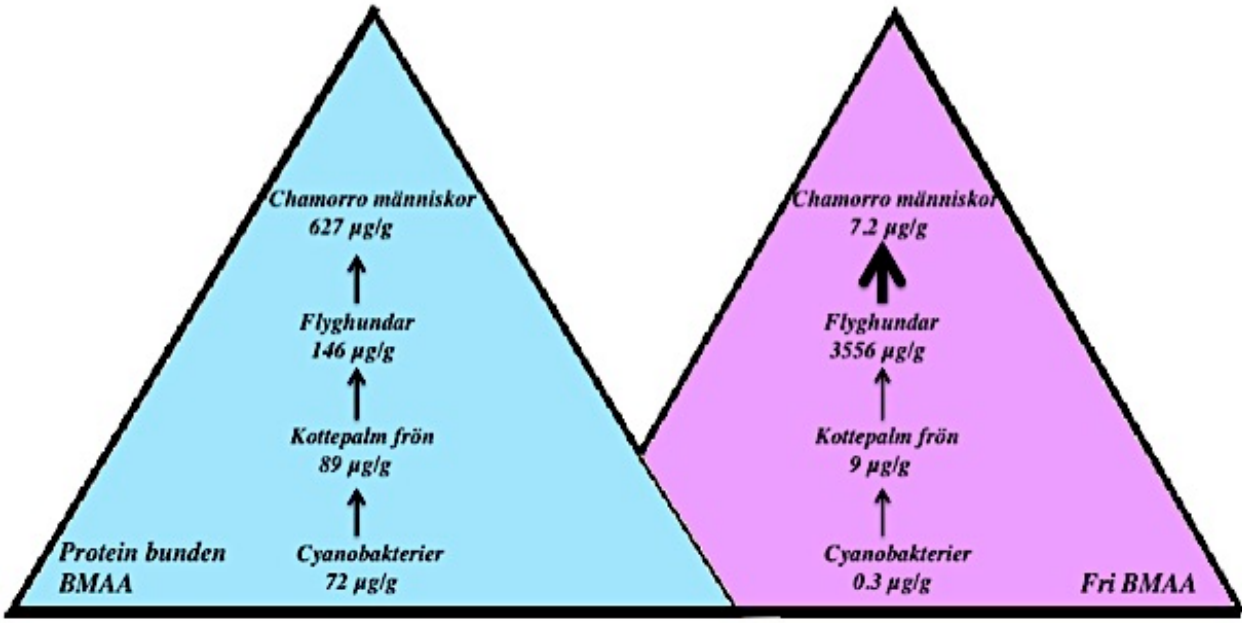
Andra studier har fokuserat på hur BMAA överförs genom olika trofiska nivåer och dess biomagnifikation. Biomagnifikation betyder helt enkelt att det finns en ökad ansamling av bioaktiva (ofta skadliga) molekyler genom högre trofiska nivåer i näringskedjan. Genom att fokusera en undersökning på detta blir det lättare att förstå hur mycket BMAA som människor skulle kunna utsättas för genom kosten. Kottepalm var vad forskare ursprungligen misstänkt vara källan till Chamorro-folkets exponering för BMAA. Mycket små mängder BMAA kunde mätas i kottepalm fröna vilket innebär att en hel del av mjölet måste ha förbrukats för att den toxiska effekten av BMAA skulle manifesteras. Det är där biomagnifiering kommer in i bilden. Flyghundar är organismer som livnär sig på dessa frön (Banack & Cox 2006), detta gör att BMAA i frön biomagnifieras när den når flyghundarna. Detta är viktigt eftersom flyghundar är en uppskattad föda bland Chamorro-folket. Detta var ursprungligen bara en hypotes, men har fått stöd av upptäckten av hög koncentration av BMAA som påträffades i museiexemplar av Guam flyghundar (Banack & Cox 2003a).

Eftersom cyanobakterier tros vara längst ned i näringskedjan där BMAA är närvarande, så testade man dessa organismer för närvaro av BMAA. Detta beror på att cyanobakterier tros ha ett symbiotiskt förhållande med kottepalmer och är källan till BMAA för kottepalm växter. För att bekräfta detta har två orelaterade kottepalm växter med cyanobakterie symbios testats för BMAA och då hittade man BMAA i båda växtarterna. Ett medelvärde av 0,3 $\mu g^{-1}g^{-1}$ BMAA identifierades i cyanobakterie proverna (Cox *et al*. 2003 ). I kottepalm, skilde sig

koncentrationen av BMAA skilde i olika delar av växtvävnaden, den högsta koncentrationen uppmättes i fortplantningsorganen (Banack & Cox 2003b). Vävnaden i fröna innehöll en medelvärdeskoncentration av BMAA på 9 $\mu g^{-1}g^{-1}$ (Cox *et al*. 2003 ). Det yttre skiktet av fröna uppmättes en medelvärdekoncentration på 1,161 $\mu g^{-1}g^{-1}$ BMAA (Cox *et al*.2003). Båda dessa delar av kottepalm växter är vävnader som är kända för att konsumeras av flyghundar (Banack & Cox 2006 ). Det yttre skiktet av kärnorna som behandlas av Chamorro-folket innehöll 240 $\mu g^{-1}g^{-1}$ BMAA, innan det omvandlas till mjöl (dessa delar är dock normalt inte konsumerad av flyghundar (Banack & Cox 2006 ). I museum prover innehållande flyghund rester fann man medelkoncentration på 3556 $\mu g^{-1}g^{-1}$ BMAA (Banack & Cox 2003b). Flyghundar konsumeras i sin helhet av Chamorro-folket, vilket tyder på att majoriteten av BMAA som förekommer i dessa organismer överförs vidare. Förutom att vara konsumerad i sin helhet, förbrukas dessa organismer till en så hög grad att det resulterade i att *P. mariannus mariannus* arten placerades på listan över utrotningshotade arter, efter *Pteropus tokudae* arten dog ut (Wiles & Payne 1986 ).

Nästa steg i utredningen av biomagnifiering av BMAA var att kontrollera hur mycket som var närvarande i Chamorro-folket. För att göra detta så användes hjärnorna av Chamorro patienter som hade dött av den neurodegenerativa sjukdomen ALS - PDC. En genomsnittlig koncentration på 6 $\mu g^{-1}g^{-1}$ fri BMAA (icke proteinbundet) upptäcktes. BMAA var inte närvarande i hjärnvävnad hos en grupp av 13 personer som hade dött av orsaker som inte var relaterade till neurodegeneration. Dessa bio-magnifikation studier visar hur koncentrationen av BMAA ökar genom näringskedjan. Detta innebär att även om små mängder kan vara närvarande längst ner i näringskedjan kan de sedan förstoras upp till 6$\mu g^{-1}g^{-1}$ hos människa i det här fallet. Detta visar att BMAA koncentrationen ökar med ca x20 från cyanobakterier tills att de kommer fram till människor (0,3 $\mu g^{-1}g^{-1}$ - 6 $\mu g^{-1}g^{-1}$). Vad som är intressant att notera är att denna studie syftar till att upptäcka fri BMAA och inte den del som är proteinbundet. Vad detta kan innebära är att högre koncentration kan finnas i de olika trofiska nivåerna. Detta var inte viktigt i detta fall eftersom de bara försökte bevisa att BMAA ackumuleras i stigande trofinivå och inte hur mycket finns i varje nivå.

Murch och kollegor har försökt mätta mängden av både protein bunden och fri (icke bunden) BMAA som ackumulerats (Figur 4). Dem hittade olika mängder av BMAA i samma organismer beroende på formen som BMAA var i. De kom fram till att protein bunden BMAA också har förmågan att ackumuleras och biomagnifieras i näringskedjan. De förslog även att detta kan vara en förklaring för varför neurodegenerativa sjukdomen manifesteras vid olika tillfällen beroende på individen. Detta då protein bunden BMAA kan lagras och frisläppas vid ett senare tillfälle och sedan orsaka utveckling av sjukdom.



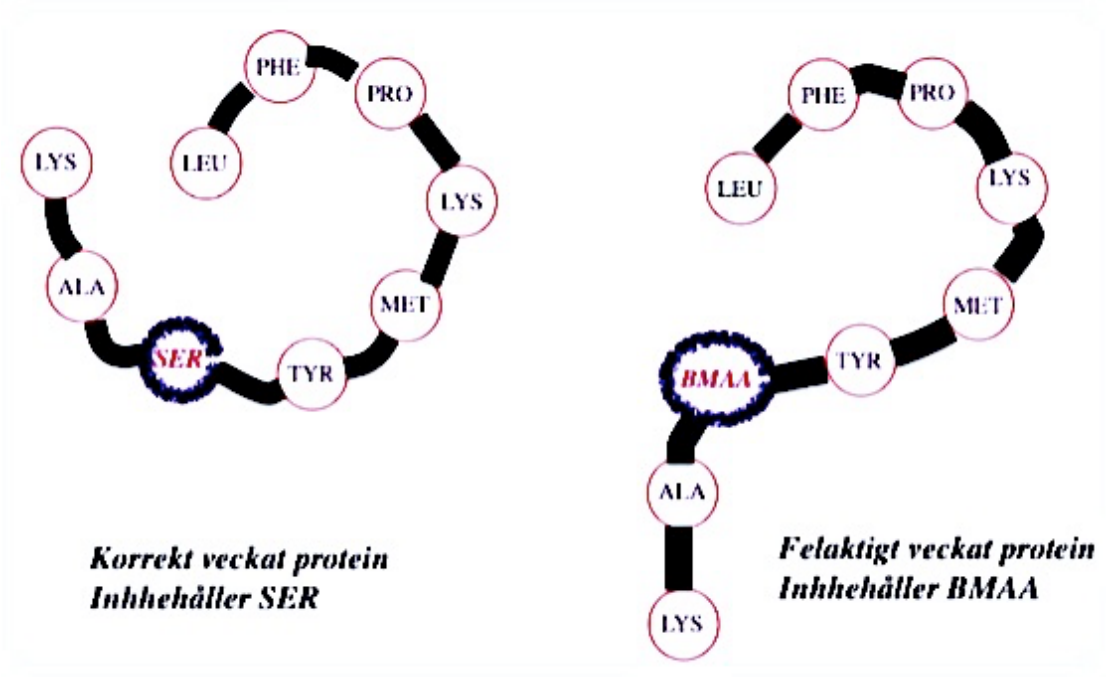

**Figur 4.** Ackumulering och biomagnifiering av protein bunden och fri (icke protein bunden) BMMA i Guam ekosystemet. Omarbetad från Murch *et al*. 2004.

## BMAA i humant protein

Mekanismerna för protein fel veckning är av ökande intresse, vid studier om Alzheimers sjukdom samt andra neurodegenerative sjukdomar. Detta beror på att dessa sjukdomar kännetecknas av aggregerat protein samt härvor. Studier har rapporterat att den icke-proteinogena aminosyran BMAA kan ersätta L-serin i humana proteiner (Dunlop *et al*. 2013). Att BMAA har möjlighet att inkorporeras i humana proteiner stöddes av Karlsson och kollegor (2009) i en studie där autobiografisk analys utfördes. En enda injektion av 3H-BMAA (radioaktivt inmärkt BMAA) hos möss visade att BMAA gav en liknande fördelning (i analysen) som för ett protein som bildar aminosyra (Karlsson *et al*. 2009). Upptag av 3H-BMAA demonstrerades i vävnader med höga nivåer av proteinsyntes, där radioaktiviteten bibehölls även efter syra extraktioner hade utförts (Karlsson *et al*. 2009). Dessa fynd är alla i överensstämmelse med införlivandet av BMAA genom proteinsyntes. För att få dessa resultat odlade Dunlop och has kollegor (2009) humana MRC-5 fibroblaster (cell i bindväv som producerar kollagen och andra fibrer) med 3H-BMAA. Mediet med fibroblaster var utarmat på aminosyror. För att kontrollera hur mycket radioaktivt BMAA införlivades så tvättades cellerna med saltlösningar efter 2, 4 och 16 timmars inkubation. De fann att BMAA inkorporerades i proteinet men också att det fanns högre koncentration av BMAA med ökad tid.

Även om BMAA har förmågan att vara felaktigt inkorporerad i protein kan detta inhiberas av aminosyran serin (Dunlop *et al*. 2013). För att ta reda på vad BMAA kan bytas ut med så gjorde man försök med alla 20 naturligt förekommande aminosyror. Resultaten visade att serin är den aminosyra som BMAA ersätter (Dunlop *et al*. 2013). Att studera den felaktiga inkorporationen av BMAA är viktigt eftersom att tidigare studier har visat att musens ”sticky” mutationen *sti* (muterade möss) resulterade i oupptäckt ersättning av $tRNA^{Ala}$ med serin. Detta resulterade senare i att serin substituerades med alanin vilket i sin tur orsakade förlust av Purkinje celler samt ataxi (förlust av full kontroll över kroppsrörelser) hos försöksdjur (Dunlop *et al*. 2013).

Det som ger icke-protein aminosyror förmågan att bli inkorporerade är att de är nära strukturella analoger av de 20 protein aminosyrorna (Rodgers & Shiozawa 2008). Vad som händer är att dessa analoger kan binda till en aminosyra-tRNA-syntas och blir felaktigt peptid bundna till en polypeptidkedja. För att vara inkorporerat i proteiner måste dessa analoger vara närvarande i tillräckliga mängder i cellen för att framgångsrikt tävla med naturliga aminosyrorna (Dunlop *et al*. 2013). Upptäckterna att BMAA kan ersättas för serin i humana proteiner ger upphov till möjligheten att en sådan inkorporering kan leda till neurodegenerativa sjukdomar. Fosforyleringen av proteiner sker typiskt på serin, treonin, tyrosin och histidinrester. Detta innebär att om BMAA sätts in på dessas ställen så kan det vara särskilt skadligt för proteiners lämpliga funktion och leder till felaktigt veckning av proteinerna (Rodgers & Shiozawa 2008, Dunlop *et al*.2013) (Figur 5). Även om dessa laboratoriestudier tyder på att BMAA har förmågan att införlivas i humant protein är mekanismerna bakom detta, liksom om/ hur detta förekommer i naturen relativt outforskade (Dunlop *et al*.2013).




**Figur 5.** En jämförelse mellan korrekt och felaktigt veckat protein. Detta då aminosyran serin (SER) ersätts med *Beta*-Metylamino-L-alanin (BMAA). Omarbetad från Holtcamp 2012.

## Diskussion

Syftet med denna litteraturstudie var att avgöra om det finns ett samband mellan exponering av BMAA och utvecklingen av Alzheimers sjukdom. För att göra detta så har studier där man har bland annat gett BMAA till olika modellorganismer och mätt mängden BMAA i hjärnvävnaden hos individer med och utan neurodegenerativa sjukdomar använts. Det var svårt att hitta studier där de som undersöker det exakta sambandet mellan Alzheimers och BMAA så istället studierna fokuserade utvecklingen av plack och härvor som ett resultat av BMAA exponering.

När man försöker att undersöka om ett visst medel har negativa effekter på organismer fokuserar toxikologer på att få reda på hur man kan komma i kontakt med substansen. Detta är viktigt eftersom att även om vissa medel är kända för att ha skadliga effekter, finner man

inte dem i överflöd i vårt dagliga liv och väcker därför inte oro. Det är därför en studie där mängden BMAA i fisk och skaldjur har inkluderats i denna rapport. Denna kvantifiering studie av Jiang och kollegor (2014) syftade till att kvantifiera nivån av BMAA i åtta av de fiskarter som konsumeras i Sverige i en hög grad. Resultaten indikerade att BMAA var bevarade i ostron, räkor, blåmusslor, strömming och röding. Koncentrationerna av BMAA i dessa fiskar varierar från 0,01 till 0,90 $\mu$g/g. De rapporterade att hade inte kunna finna var dock inte kunna upptäcka BMAA i abborre, lax, torsk och kräftor. Detta innebär att mänskor kommer i kontakt med BMAA oralt via konsumtion av fisk, vilket gör det ganska relevanta.

Att ha kunskap om att BMAA var närvarande i dessa fiskar säger inte särskilt mycket och därför har studier där man undersökt vad som händer när BMAA intas oralt tagits med. För att göra detta har unga och gamla markattor används. Modellorganismerna fick sedan med olika mängder av BMAA och i vissa fall kost aminosyran L-serin under 140 på varandra följande dagar. Resultaten från denna studie tyder på att kronisk exponering för BMAA kan utlösa Alzheimers liknande amyloid plack och NFT i hjärnan. Markattor som matats lika mängder av L-BMAA och L-serin hade en reducerad densitet av härvor. Markattor som matats en placebo dos av ris mjöl visade ingen utveckling av neuropatologi. Forskaren föreslår att L-serin kan vara en potentiell behandling för dessa onormal struktur men förespråkar inte dess användning på patienter just nu, eftersom mekanismerna och biverkningar bakom detta inte är helt klarlagda. I tillägg till detta är det också viktigt att notera att dessa onormala strukturer observerades i både unga och gamla individer. Detta är en av de allra första studier där forskare har framgångsrikt kunnat producera härvor och plack genom exponering av en miljö neurotoxin.

**Brister i analysmetoderna.**
Vad som verkar vara ett stort problem är att metoden för att extrahera BMAA har ännu inte fullständigt utvecklats. Detta beror på att intresset för detta nervgift är ganska nytt, och växer fortfarande. Detta kan förklara varför en del av det insamlade data anger att neurotoxinet förekommer i vissa prov och frånvarande i andra. Dessutom har ingen möda lagts i studierna för att säkerställa att det är BMAA som upptäcks och inte dess isomerer.

**Dosberoende**
Den allmänna bilden av litteraturen är att effekten av BMAA är dos beroende. Vad detta innebär är att mer studier där olika doser av BMAA administreras till modellorganismer är avgörande. Utöver detta, måste det finnas en omvärdering av vilken modellorganismer som är bäst lämpade.

Det intressanta är att det inte fanns någon BMAA som upptäckts i hjärnan hos patienter som inte hade dött av neurodegeneration, men verkade ändå vara exponerad till samma miljö. Så detta kan innebära att även om de konsumerade maten, påverkades inte dem negativt av BMAA. Då kanske BMAA påverkar människor som redan löper risk för Alzheimers och inte vem som helst. Dessutom hittades inte BMAA i patienter som hade dött av Huntingtons, som också är en neurodegenerativ sjukdom men har en genetisk orsak. Detta är märkligt eftersom det är högst osannolikt att människor som bor i samma omgivning och konsumera samma mat, inte utsätts för samma saker. Förklaring till detta kan vara att vissa individer kan ha en genetisk sårbarhet för BMAA. Det finns dock inga studier som har gjorts för att undersöka den genetiska koppling mellan BMAA, vilket kan vara något för framtida forskning.

**Framtidsperspektiv**
Om man tittar på litteratur om sambandet mellan BMAA och Alzheimers och neurodegenerativa sjukdomar i allmänhet, är det svårt att komma till en konkret slutsats. De data som finns ger dock en god grund för framtida studier. En av de sakerna som kan göras i framtiden är att försöka studera interaktionen mellan BMAA med andra gifter och dess egna isomerer. Gifter är oftast inte närvarande på egen hand och vi är oftast utsatta för flera samtidigt även i en enda miljö. Tidigare forskning har fokuserat enbart på mekanismerna av BMAA och dess roll i neurodegenerativa sjukdomar. Att försöka förstå effekterna av en ”cocktail” av gifter kan därför ge en bredare och bättre förståelse för deras roll i dessa sjukdomar. Det är inte heller realistiskt att bara fokusera på en exponerings väg eftersom att vi brukar utsättas för samma toxin genom flera olika sätt. Detta innebär att framtida studier kan inriktas på hur mycket BMAA en person kommer i kontakt med i sin vardag.

Vad är anmärkningsvärt i de aktuella studierna är att de har använt mycket små provstorlekar. Detta innebär att även om de flesta av studierna visar en koppling mellan BMAA och Alzheimers sjukdom, kan det vara beroende av andra faktorer. Så för framtida studier rekommenderas att man använder sig av större provstorlekar. Detta kan dock ta upp några etiska flaggor eftersom fler modellorganismer kommer att behöva utnyttjas.

Vad man kan säga med säkerhet med hjälp av studierna som diskuterats i den här litteraturstudien är at BMAA har förmågan att leda till produktionen av amyloid plack och NFT. Det går dock inte att hävda med säkerhet att exponering för BMAA kan leda till utveckling av Alzheimer vid denna tid. Detta då det inte fanns mycket data från studier som specifikt fokuserar på kopplingen mellan BMAA och Alzheimer utan bara de abnormala strukturerna som den har gemensamt med andra neurodegenerativa sjukdomar.

## Tack
Stort tack till Cecilia Berg och Elena Jazin för handledningen samt min seminariegrupp för återkoppling. Jag vill även tacka min familj för stöd och uppmuntran under skrivprocessen.

## Referenser


Banack SA, Caller TA, Stommel EW. 2010. The Cyanobacteria Derived Toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Toxins **2**: 2837-2850.

Banack SA, Cox PA. 2003a. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes. Neurology **60**:387-389.

Banack SA, Cox PA. 2003b. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes Implications for ALS-PDC in Guam. Neurology **61**:387–389.

Banack SA, Cox PA. 2003c. Distribution of the neurotoxic nonprotein amino acid BMAA in Cycas micronesia. Botanical Journal of Linnean Society **143**: 165–168.

Banack SA, Cox PA. 2006. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. Journal of Ethnopharmacology **106**:97–104.

Banack SA, Metcalf JS, Jiang L, Craighead D, Ilag LL, Cox PA. (2012). Cyanobacteria produce N-(2-aminoethyl) glycine, a backbone for peptide nucleic acids which may have been the first genetic molecules for life on earth. Public Library of Science doi: 10.1371/journal.pone.0049043.

Berntzon L, Erasmie S, Celepli N, Eriksson J, Rasmussen U, Bergman B. 2013. BMAA inhibits nitrogen fixation in the cyanobacterium Nostoc sp. PCC 7120. Marine drugs **11**:3091-3108.

Bidle KD, Manganelli M, Azam F. 2002. Regulation of oceanic silicon and carbon preservation by temperature control on bacteria. Science **298**:1980-1984.

Bird TD. 2008. Genetic Aspects of Alzheimer Disease. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics **10**: 231-239.

Blennow K, Bogdanovic N, Alafuzoff I, Ekman R, Davidsson P. 1996. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: relation to severity of dementia, but not to senile plaques, neurofibrillary tangles, or the ApoE4 allele. Journal of Neural Transmission **103**: 603–618.

Borenstein AR, Copenhaver CI, Mortimer JA. 2006. Early-life risk factors for Alzheimer disease. Alzheimer Disease & Associated Disorders **1**: 63-72.

Bradley WG, Mash DC. 2009. Beyond Guam: The Cyanobacteria /BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases Amyotrophic Lateral Sclerosis, doi: 10.3109/17482960903286009.

Brister MA, Pandey AK, Bielska AA, Zondlo NJ. 2014. OGlcNAcylation and phosphorylation have opposing structural effects in tau: phosphothreonine induces particular conformational order. Journal of the American Chemistry Society **136**: 3803– 3816.

Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, FaganAM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C. 2011. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-β peptide clearance. Science Translational Medicine, doi 10.1126/scitranslmed.3002156.

Cox PA, Banack SA, Murch SJ. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative diseases among the Chamorro people of Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences **100**: 13380–13383**.**

Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf JS, Banack SA. 2016. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. Proceedings Royal Society Publishing B **283**: 1-10.

Daebel V, Chinnathambi S, Biernat J, Schwalbe M, Habenstein B, Loquet A, Akoury E, Tepper K, ller , Baldus M. 2012. β-Sheet core of tau paired helical filaments revealed by solid-state NMR. Journal of the American Chemical Society **134**: 13982–13989.

Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers KJ. 2013. The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. Public Library of Science **8**: 1-8.

Green RC, Roberts JS, Cupples LA, Relkin NR, Whitehouse PJ, Brown T, Eckert SL, Butson M, Sadovnick AD, Quaid KA. 2009. Disclosure of APOE genotype for risk of Alzheimer's disease. The New England Journal of Medicine **361**: 245–254.

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. 2006. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. Archives of general psychiatry **63**: 168-174.

Holtcamp W. 2012.The emerging science of BMAA: Do cyanobacteria contribute to neurodegerative diseases?. Environmental Health Perspectives **120**: 110-116.

Igbavboa U, Sun GY, Weisman GA, He Y, Wood WG. 2009. Amyloid β-proteinstimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the golgi complex in mouse primary astrocytes. Neuroscience **162**: 328–338.

Jiang L, Aigret B, DeBorggraeve WM, Spacil Z, Ilag LL. 2012. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. Analytical and bioanalytical chemistry **6**:1719-1730.

Jiang L, Kiselova N, Rosén J, Ilag LL. 2014. Quantification of neurotoxin BMAA (b-N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. Scientific reports **4**:1-7.

Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, Rujescu D, Hampel H, Giegling I, Andreassen OA, Engedal K, Ulstein I, Djurovic S, Ibrahim-Verbaas C, Hofman A, Ikram MA, van

Duijn CM, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. 2013. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. The New England Journal of Medicine **368**: 107–116.

Karamyan VT & Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. Life Science **82**: 233-246.

Karlsson O, Berg C, Brittebo EB, Lindquist NG. 2009. Retention of the cyanobacterial neurotoxin β-N-methylamino-l-alanine in melanin and neuromelanin-containing cells–a possible link between Parkinson-dementia complex and pigmentary retinopathy. Pigment cell & melanoma research **22**:120-130.

Li N, Liu K, Qiu Y, Ren Z, Dai R, Deng Y, Qing H. 2016. Effect of Presenilin Mutations on APP Cleavage; Insights into the Pathogenesis of FAD. Frontiers in Aging Neuroscience, doi:0.3389/fnagi.2016.00051.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA. 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**:12228-12231.

Murphy MP, LeVine, H. 2010. Alzheimer's Disease and the β-Amyloid Peptide. Journal of Alzheimer's Disease JAD **19**:1-17.

Rodgers KJ & Shiozawa N. 2008. Misincorporation of amino acid analogues into proteins by biosynthesis. The international journal of biochemistry & cell biology **40**:1452-1466.

Rosén J, Westerberg E, Schmiedt S, Hellenäs KE. 2016. BMAA detected as neither free nor protein bound amino acid in blue mussels. Toxicon **109**: 45-50.

Rosén J, Hellenäs KE. 2008. Determination of the neurotoxin BMAA (β-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). Analyst **12**:1785-1789.

Snyder LR, Cruz-Aguado R, Sadilek M, Galasko D, Shaw CA, Montine TJ. 2009. Lack of cerebral bmaa in human cerebral cortex. Neurobiology **72**:1358-1363.

Tariot PN, Federoff HJ. 2003. Current treatment for Alzheimer disease and future prospects. Alzheimer Disease and Associated Disorders 1**7**: 105-113.

Wiles GJ, Payne NH. 1986. The trade in fruit bats Pteropus spp. on Guam and other Pacific Islands. Biological Conservation **38**:143-161.

# Finns det ett samband mellan exponering för *beta*-Methylamino-L-alanine (BMAA) och utveckling av Alzheimers?

*Etisk bilaga*

**Ruth Ayele Nigatu**

Självständigt arbete i biologi 2016

Den viktigaste etiska frågan i Alzheimers forskning är enligt mig djurförsök. I de artiklar som jag har använt har de flest studier baserats på djur. Normalt så tycker jag att man inte ska använda sig av djur om det inte är absolut nödvändigt, men i det här fallet verkar det vara det. Vid Alzheimers forskning är djurförsök oerhört viktigt eftersom det inte är möjligt att göra test på levande människor, även när det gäller behandlingar. När det kommer till människor så kan man inte direkt kolla på mekanismerna bakom Alzheimers för att man inte kan ge en människa ett neurotoxin och försöka se vad som händer. Så det är på grund av både etiska och forskningsskäl.

Så det finns inte det finns ingen väg runt detta, men det är möjligt att vara försiktig och kanske inte använda alltför många individer, och bara använda den mängd som krävs. Det finns inte mycket som verkligen kan sägas eftersom att vi fortfarande inte vet helt om patologin av Alzheimers liksom orsakerna om de kan vara genetiskt, miljö- eller på annat sätt. Detta innebär att när man framkallar Alzheimers liknande symtom i försöksdjur så kan man kanske inte vara säkra på vad vi ska förvänta oss. Det betyder då att djuren kan utsättas för symptom som kan potentiellt vara smärtsamma.

När det gäller att testa behandling Alzheimers patienter, så krävs det alltid medgivande (informerat samtycke). Men det är i de senare stadierna av Alzheimers trots att patienterna kan ge samtycke, man kan inte säkert säga att det är lämpliga nog. Detta beror på Alzheimers oftast i de senare stadierna av Alzheimers sjukdom är personen arbetsoförmögen och kanske inte fattar ett beslut som de normalt skulle göra. I vissa fall så får familjemedlemmar vara ansvariga för patienten efter en viss stadie men detta löser inte heller problemet helt.

**Forskningsetik**

Jag har mestadels använt WebOfScience och PubMed för att leta efter artiklar, detta då jag anser att dessa databaser är pålitliga. Jag har även försökt granska metoderna noggrant som artiklarna använt och frågat mig själv om man kan verkligen komma fram till slutsatsen de gjort. Dessutom de artiklar som jag har använt har etiskt godkännande (de sade detta i artiklarna) som innebär att de har följt antigen lokala eller globala etiska regler. Att artiklarna har etiskt godkännande betyder då att de har framgångsrikt visat att dem behövde använda sig av antigen levande djur eller döda patienters hjärnor. Detta då kanske deras studier skulle leda till at man kommer vidare i Alzheimers forskning.