

	Dossier: AVD10800202518822	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	1X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Het effect van omega 3-vetzuren op het voorkomen, vertragen en behandelen van de ziekte van Parkinson
NTS-identificatiecode	NTS-NL-406018 v.1, 22-08-2025
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Omega 3-vetzuren Parkinson
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Parkinson is een ziekte van de hersenen die steeds erger wordt en die grote invloed heeft op het dagelijks leven van patiënten. Hoewel er behandelingen bestaan om de verschijnselen te verlichten, is er nog geen genezing of effectieve manier om de ziekte te voorkomen of vertragen.</p> <p>In dit project onderzoeken we of omega 3-vetzuren uit verschillende bronnen zoals vissen, kleine planktongarnaaltjes (krill genaamd) of algen, een positief effect hebben op het voorkomen, vertragen en behandelen van de symptomen van Parkinson in een muismodel. Omega 3-vetzuren staan bekend om hun gezondheidsvoordelen, maar niet alle bronnen van omega 3 zijn even duurzaam. Visolie wordt traditioneel veel gebruikt, maar overbevissing bedreigt de hoeveelheid vissen en het milieu. Algenolie en krillolie zijn duurzamere alternatieven: algenolie is volledig plantaardig (veganistisch), en krillolie wordt verkregen uit kleine kreeftachtigen. Beide bronnen zijn duurzamer dan visolie.</p> <p>We willen ook kijken of de verschillende vormen waarin omega 3-vetzuren voorkomen invloed hebben op hoe goed deze vetzuren in het lichaam worden opgenomen en hun effect kunnen uitoefenen. Omega 3 uit visolie heeft een andere 'bouwsteenstructuur' dan omega 3 uit algenolie en krillolie. Deze verschillen in structuur kunnen invloed hebben op hoe goed het lichaam de omega 3-vetzuren opneemt en gebruikt. Door deze verschillende vormen te vergelijken, kunnen we beter begrijpen welke bron van omega 3 het meest effectief is en tegelijkertijd het milieu minder belast. Met deze studie hopen we bij te dragen aan de zoektocht naar duurzamere behandelingsmogelijkheden voor hersenziekten zoals Parkinson en mogelijk een stap te zetten richting betere voorkoming en behandeling van deze ziekte.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>Dit project kan zowel op de korte- als lange termijn belangrijke voordelen opleveren voor de wetenschap, de maatschappij en het milieu.</p> <p>Korte termijn</p> <p>Tijdens de looptijd van het project verwachten we meer inzicht te krijgen in de rol van omega 3-vetzuren bij het voorkomen, vertragen en behandelen van de symptomen van Parkinson. Het vergelijken van omega 3 uit verschillende bronnen (visolie, algenolie en krillolie) geeft ons waardevolle informatie over hoe deze vetzuren door het lichaam worden opgenomen en hoe ze hun effect uitoefenen.</p> <p>Dit onderzoek kan een basis leggen voor toekomstige studies naar de relatie tussen voeding en hersenaandoeningen, en mogelijke behandelingen die op voeding gebaseerd zijn. Het biedt daarnaast waardevolle inzichten voor de ontwikkeling van duurzamere keuzen voor visolie.</p> <p>Lange termijn</p> <p>Op de lange termijn kan dit project bijdragen aan betere behandelingen voor de ziekte van Parkinson en bijdragen aan strategieën om de ziekte te voorkomen. Als blijkt dat omega 3-vetzuren</p>

uit algenolie of krillolie een vergelijkbare of zelfs betere werking hebben dan visolie, kan dit leiden tot een verschuiving naar duurzamere en meer milieuvriendelijke bronnen van omega 3. Dit is van groot belang gezien de toenemende druk op vissen door overbevissing.

Voor veganistische georiënteerde diëten biedt algenolie een toegankelijke manier om de gezondheidsvoordelen van omega 3 binnen te krijgen. Bovendien kan dit onderzoek bijdragen aan een bredere bewustwording over het effect van voeding op de gezondheid van het brein. Dit is niet alleen voor Parkinsonpatiënten belangrijk, maar voor de gehele bevolking.

Tot slot kan de kennis die dit project oplevert ook toepassingen vinden buiten Parkinson, bijvoorbeeld in onderzoek naar andere hersenziekten of ziekten gerelateerd aan ontstekingen.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Om muizen Parkinson te laten krijgen, geven we ze dagelijks een klein beetje van een chemische stof, waarvan bekend is dat deze bij muizen net als bij mensen Parkinson veroorzaakt. Dit doen we door het in hun maag te brengen met een klein buisje. We gebruiken hiervoor bij voorkeur een zacht buisje om ervoor te zorgen dat de muizen zo min mogelijk ongemak ervaren. Dit middel zorgt ervoor dat de muizen milde verschijnselen van Parkinson ontwikkelen, zoals een iets slechtere beheersing van hun poten.

De oliën die we onderzoeken krijgen ze te eten.

Tijdens de studie houden we de voortgang van de symptomen nauwkeurig in de gaten. Eén keer per week doen de muizen testen, waarmee we kijken hoe hun klachten zich ontwikkelen. Zo laten we de muizen balanceren op een draaiende staaf om hun evenwicht te meten. Daarnaast doen we een geheugentest, waarmee we kijken hoe goed het geheugen van de muizen is.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

Tijdens het onderzoek krijgen de muizen maximaal negen weken lang een kleine hoeveelheid van een middel toegediend dat Parkinson-verschijnselen veroorzaakt. Dit gebeurt door het voorzichtig in hun maag te brengen met een zachte bus en dat kan onprettig voor de muizen zijn. Na ongeveer drie weken behandeling verwachten we dat de muizen klachten ontwikkelen. Een van de belangrijkste effecten is dat de muizen hun poten minder goed kunnen bewegen. Dit kan invloed hebben op hun coördinatie en evenwicht, maar het zal ze niet volledig beperken in hun dagelijkse activiteiten, zoals het verzamelen of verkrijgen van voeding of het hebben van interactie met kooigenoten.

De muizen kunnen daarnaast een lichte vermindering in hun activiteit laten zien door de symptomen van Parkinson. We houden de dieren gedurende de hele studieperiode goed in de gaten, en als we merken dat de klachten voorbij de aangegeven ongeriefscore dreigen te komen, zullen we direct passende maatregelen nemen.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

<i>Soort:</i>	<i>Totaal aantal</i>	<i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i>			
		<i>Terminaal</i>	<i>Licht</i>	<i>Matig</i>	<i>Ernstig</i>
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	300	0	0	300	0

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

<i>Soort:</i>	<i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i>		
	<i>Hergebruikt</i>	<i>Teruggeplaatst</i>	<i>Geadopteerd</i>

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

Na de procedure hebben we de hersenen van de muizen nodig om te onderzoeken wat er daar is gebeurd. We kijken hoeveel hersencellen nog gezond zijn en hoeveel omega 3 er is opgenomen in de hersenen. Dit is belangrijk om te begrijpen of de omega 3-vetzuren kunnen helpen bij het beschermen van de hersenen tegen de schade die Parkinson veroorzaakt.

Daarnaast onderzoeken we ook het bloed van de muizen. We kijken naar de afweercellen in het bloed en hoe deze reageren op de behandeling. Ook meten we hoeveel omega 3 er in het bloed aanwezig is. Deze informatie is essentieel om te begrijpen hoe omega 3 het lichaam beïnvloedt, zowel in de hersenen als in het immuunsysteem.

Tot slot, gaan we kijken naar de darmen van de muizen omdat andere onderzoekers hebben gezien dat de ziekte van Parkinson invloed heeft op hoe de darmen eruit zien.

Voor deze onderzoeken is het noodzakelijk om de dieren aan het einde van de studie te doden. Dit is nodig om de hersenen en het bloed op de juiste manier te kunnen verzamelen. We zorgen ervoor dat dit op een zo snel en menselijk mogelijke manier gebeurt, met minimale stress of pijn voor de dieren.

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Binnen dit onderzoek hebben wij al studies uitgevoerd op het laboratorium onder andere met celmodellen en vertering (hoe eten afgebroken wordt) in reageerbuisjes. We hebben verschillende oliën vergeleken en gekeken hoe ze hun omega 3 verpakten. We hebben ook gekeken hoe de verschillende oliën verteren, of ze door onze zelfgemaakte darmpjes heen wilden en of ze door onze zelfgemaakte bloed-breinbarrière bewogen. Dit hebben wij gedaan met dertien oliën en de meest belovende vier oliën willen wij verder testen. Deze laboratoriumtesten zijn een goed begin, maar ze geven niet altijd een goede voorspelling voor wat er in het lichaam gebeurt. Het lichaam is veel ingewikkelder en we zullen veel missen in de simpele laboratoriummethoden. Daarom is het helaas niet mogelijk om alle experimenten volledig te vervangen door diervrije alternatieven.

Voor dit onderzoek willen we de verteerbaarheid, opname, doorgang van omega -3-vetzuren door de bloed-hersenbarrière en de effecten op het immuunsysteem van verschillende bronnen van omega 3 (vis, algen en krill) bestuderen. Hiervoor zijn dierstudies essentieel, omdat we alleen in een levend organisme het volledige proces kunnen onderzoeken.

Het effect van verschillende bronnen van omega 3 kan niet volledig worden getest met celmodellen of andere diervrije alternatieven. In dit project gebruiken we een goed bewezen methode om de symptomen van Parkinson na te bootsen met een stofje dat we via de mond aan de muizen geven. Met dit model, dat in onze groep al vaak is gebruikt, hebben we betrouwbare resultaten behaald als het gaat om motorische problemen, geheugenproblemen en darmklachten.

De kennis die we met dit onderzoek opdoen, is essentieel om verder te begrijpen hoe omega 3 uit duurzame bronnen (zoals algen en krill) kan bijdragen aan de gezondheid van de hersenen en het immuunsysteem. Hoewel we waar mogelijk diervrije alternatieven gebruiken, kunnen we zonder dierstudies geen volledig beeld krijgen van de effecten van omega 3-vetzuren in een levend lichaam, met name de darmen en de hersenen.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Bij het bepalen van het aantal dieren voor dit project hebben we zorgvuldig gekeken naar de minimale hoeveelheid die nodig is om betrouwbare en wetenschappelijk relevante resultaten te behalen, die we zouden kunnen publiceren. We hebben berekeningen uitgevoerd om ervoor te zorgen dat het aantal dieren voldoende is om duidelijke conclusies te trekken, maar zo klein mogelijk blijft om onnodig gebruik van dieren te voorkomen.

Om het aantal dieren verder te beperken, hebben we de opzet van de studie zo goed mogelijk ontworpen. Zo gebruiken we eerdere projecten en literatuurgegevens om de meest geschikte doseringen en meetmomenten te bepalen. Dit voorkomt dat onnodig veel dieren worden ingezet om dit eerst te testen.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling,

Om ervoor te zorgen dat de muizen zo min mogelijk ongemak ervaren tijdens het onderzoek, nemen we verschillende maatregelen. Een belangrijke stap is om de muizen te laten wennen aan de handelingen die we uitvoeren. Omdat we de muizen meerdere keren een stofje moeten toedienen via een zacht buisje in hun maag, trainen we ze om hiermee vertrouwd te maken. Dit doen we door de dieren vanaf jonge leeftijd regelmatig op een zachte en rustige manier te hanteren en geleidelijk

<p>pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>kennis te laten maken met het buisje. Hierdoor ervaren ze minder stress tijdens de studie.</p> <p>Daarnaast worden de muizen gehuisvest in groepen, zodat ze sociaal contact hebben met andere dieren. Hun omgeving wordt verrijkt met speeltjes en materialen om ze actief en bezig te houden, wat helpt om stress te verminderen en hun welzijn te verbeteren.</p> <p>We houden de dieren ook nauwlettend in de gaten. Er wordt regelmatig gecontroleerd of de muizen gezond blijven en of ze geen onverwacht ongemak ervaren door de behandeling. Als we merken dat een muis tekenen van pijn of stress vertoont, nemen we direct maatregelen.</p> <p>Gedurende de looptijd van het project blijven we op de hoogte van nieuwe technieken die het welzijn van de dieren kunnen verbeteren. Als er nieuwe verfijningstechnieken beschikbaar komen, zoals verbeterde training of pijnbestrijding, passen we deze direct toe om de belasting voor de dieren verder te verminderen.</p> <p>Met deze aanpak doen we er alles aan om het leed voor de dieren tot een minimum te beperken en hen zo comfortabel mogelijk te houden tijdens het onderzoek.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Voor dit onderzoek hebben we gekozen voor C57/Bl6J-muizen. Deze muizensoort is ideaal voor ons onderzoek omdat ze goed reageren op de stof die we gebruiken om de symptomen van Parkinson na te bootsen. Dit model is uitgebreid getest in deze soort, en het is gebleken dat deze muizen niet alleen motorische symptomen (het trillen in Parkinsonpatiënten) ontwikkelen, maar ook niet-motorische symptomen, zoals geheugen- en darmproblemen. Dit maakt het model erg geschikt om de situatie bij mensen met Parkinson zo goed mogelijk na te bootsen.</p> <p>We werken met muizen die acht weken oud zijn aan het begin van het onderzoek. Dit is een leeftijd waarop ze volwassen zijn, maar nog jong genoeg om de effecten van de behandeling goed te kunnen bestuderen. Deze keuze is gebaseerd op eerdere succesvolle studies in ons laboratorium met hetzelfde model en dezelfde muizensoort.</p> <p>Door deze soort en leeftijd te kiezen, kunnen we ervoor zorgen dat onze resultaten betrouwbaar en waardevol zijn voor het bestuderen van Parkinson en de mogelijke effecten van omega 3 uit verschillende bronnen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 7.11.202509031141 (d744084)Version date: 2025-09-03 11:41:56

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy_policy](#) | [Legal notices](#) | [Accessibility](#)

1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
	E-mailadres		
1.6 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
	E-mailadres		
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569	
	E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl	
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>		
	<input checked="" type="checkbox"/> Nee		

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hieronder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2 Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hieronder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6.

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01/11/2025
	Einddatum (t/m)	5 jaar na verlenen vergunning
3.2 Wat is de titel van het project?	The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het effect van omega 3-vetzuren op het voorkomen, vertragen en behandelen van de ziekte van Parkinson	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
	Postadres	Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT
	E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (Indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	UU-ASC	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:		
Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT	
E-mail: asc.factuur@uu.nl			

4.2 (Optioneel.) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 1
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
Overige bijlagen, indien van toepassing	
<input type="checkbox"/> Melding machtiging	
<input type="checkbox"/>	

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	
Handtekening	



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0800-789 0789).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are critical in maintaining overall health, particularly in brain function and cardiovascular health. They have been shown to reduce inflammation, support neuron function, and improve cognitive performance, making them vital for both physical and mental well-being.

Given their wide-ranging benefits, ensuring adequate intake of omega-3 fatty acids is crucial for promoting long-term health and preventing chronic disease. Omega-3 fatty acid or Docosahexaenoic acid (DHA, supplementation) has been reported to have a positive health effect on many diseases including cardiovascular disease, diabetes mellitus, cancer, Alzheimer's Disease, depression, and Parkinson's Disease [1]. It is thought that these health benefits from omega-3 PUFAs are mainly due to their anti-inflammatory properties.

In light of the growing global demand for omega-3 fatty acids, algae oil presents a sustainable and vegan-friendly alternative to traditional sources such as fish oil [2]. Overfishing has placed significant pressure on marine ecosystems, raising concerns about the long-term availability of fish-derived omega-3s. In 2019, only 64,6% of the total fish catch was sustainable, with the remaining percentage being overfished according to the Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Krill oil is more sustainable than fish oil, but algae oil is the most sustainable form of omega-3 fatty acids [2]. Algae oil, derived from microalgae, directly provides DHA without relying on fish as intermediaries in the food chain, significantly reducing environmental impact. The algae strain, *Schizochytrium sp.*, is kept in stable laboratories, which minimizes the genetic drift. In contrast to what people think, algae oil is often more consistent than fish oil. In fish oil, the composition of oil depends on the fishery, season, location, and contamination (by heavy metals, for example). Additionally, algae oil offers a plant-based option, making omega-3 supplementation accessible to individuals adhering to vegetarian or vegan diets. Since fish (oil) is linked to numerous health benefits, including positive effects in neuroinflammatory diseases such as Alzheimer's Disease, depression, and Parkinson's Disease, it is important to know if sustainable alternatives have the same positive effect [1], [3]. Therefore, investigating the efficacy of algae oil in preventing Parkinson's Disease (PD) is essential to establish it as a sustainable and eco-conscious alternative to fish oil, addressing critical environmental and ethical concerns.

The chemical forms of omega-3 fatty acids vary between fish, algae, and krill oils, potentially influencing their bioavailability and biological activity [4], [5], [6]. Fish oil primarily contains DHA in the form of triacylglycerols (TAGs), where DHA typically occupies the sn-2 position on the glycerol backbone, which is not cut off during digestion leaving a monoacylglycerol-DHA (MAG-DHA) [7], [8]. Algae oil also provides DHA in TAG form, but with a different fatty acid composition, and DHA is next to the sn-2 position, also positioned at the sn-1/3 positions, which can be cut off during digestion leaving DHA in the free fatty acid (Free-FA-DHA) form [9]. This positional difference could alter enzymatic hydrolysis and absorption efficiency, potentially influencing its bioavailability and efficacy, as seen in our *in vitro* studies. In contrast, krill oil delivers omega-3s mainly as phospholipids, which integrate more readily into cell membranes and may enhance biological activity [6]. This study aims to evaluate how these structural differences in omega-3 forms influence their neuroprotective potential, comparing fish oil, algae oil, and krill oil in the context of PD prevention, while also considering their sustainability.

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by bradykinesia and tremor. Increasing age and the male gender are risk factors for PD and currently, as the population ages, PD is taking an increased toll on the world's health [10]. It is estimated that around 3% of the population over 80 is affected. Unfortunately, no medicine stops the disease. Currently, drugs and treatments are focused on improving day-to-day life but are also known to carry side effects. Inventing a drug that will cure PD is not feasible in the near future due to the loss of dopaminergic neurons, which cannot be restored. Therefore, treatments so far focussed on preventing the disease and are more promising.

A promising candidate in the prevention of PD is Omega-3 [11], [12], [13]. Omega-3 PUFAs are important precursors of anti-inflammatory molecules and play a crucial role in maintaining cell membrane integrity and function. They contribute to the protection of neurons by reducing oxidative stress and inflammation, both of which are key factors in the progression of neurodegenerative diseases e.g. PD [3]. Furthermore, Omega-3 PUFAs have been shown to modulate the aggregation of alpha-synuclein, potentially slowing down the neurodegenerative processes associated with Parkinson's disease [14].

In Parkinson's Disease, omega-3 has been found to have beneficial effects by lowering inflammation, improving motor functions, and showing neuroprotective properties [15], [16]. There are several reasons why omega-3 might reduce the risk of PD (Figure 1). First, besides omega-3's anti-inflammatory properties, the PUFAs also have anti-oxidative and neuroprotective properties. Secondly, omega-3 FAs are important components of the cell membrane; they maintain the structure, permeability, and fluidity of membranes, which are important functions for the interactions between genes and proteins, receptors, and channels. Thirdly, omega-3s are precursors for endogenous cannabinoids; which is important for the control of movement by modulating dopaminergic activity in the basal ganglia. Lastly, one of the major hallmarks in the brain of PD patients is α -synuclein pathology. Genes involved in lipid metabolism contribute to the onset and development of this pathology and omega-3 might prevent this [14], [17], [18].

In multiple studies on mice and rats with induced PD, it was found that feeding mice/rats omega-3 PUFAs improved motor and/or cognitive functions [11], [12], [13], [19]. In our laboratory, Perez-Pardo *et. al.* previously showed improved latency to fall and less dopaminergic cell loss in the substantia nigra (SN) when feeding mice with PD symptoms an 'active diet' that contained fish oil and uridine-monophosphate compared to a control diet that lacked omega-3 FAs [19]. Luchtman *et. al.* showed that when mice with a PD phenotype, due to prior 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-probenecid injection, were fed a diet consisting of 0.8% eicosapentaenoic acid (EPA) instead of 0.8% palm oil, they needed less time to climb a pole suggesting improved motor functions. Also, the EPA mice required less time to escape in the Morris water maze test, indicating improvement of their cognitive function [11]. Tanriover *et. al.* showed that when feeding DHA (36 mg/kg) to male Wistar rats with induced PD from MPTP infusion, they tended to stay longer on the vertical pole test than the control group, also suggesting the improvement of motor functions upon DHA supplementation [12]. Furthermore, the study of Delattre *et. al.* used male Wistar rats with induced PD by oxidopamine (6-OHDA) infusion and fed them fish oil containing 120 mg EPA and 180 mg DHA for 10 weeks and also saw an improvement of rotational behaviour [13].

Similarly to the findings in mice, human studies suggest that omega-3 PUFA intake is associated with a lower risk of PD [1] (Table 1). Long-term dietary assessments, particularly in large cohort studies, indicate a potential protective effect of omega-3 PUFAs. However, these studies also highlight the influence of external factors such as overall diet quality, lifestyle, and genetic predisposition, which may affect the outcomes. While these observational studies provide valuable insights, they are inherently limited compared to controlled animal studies, where specific mechanisms can be directly tested. For example, in mice, it is possible to measure direct changes in dopaminergic cell survival, neuroinflammation, and behavioral performance under tightly controlled dietary conditions, whereas such precise mechanistic evaluations are not feasible in human studies. Notably, none of these studies tested algae-derived omega-3 sources, leaving an open question about their potential efficacy compared to fish oil.

N° Patients	Population Characteristic	Type and Dose Supplementation	Exposure Period	Results
8006	PD Honolulu-Asia Aging Study	Food frequency questionnaire	30 years	Omega-3 PUFAs appeared protective.
5289	PD Rotterdam Study The Netherlands	Semiquantitative food frequency questionnaire	6 years	Intakes of omega-3 PUFAs were significantly associated with a lower risk of PD.
131,368	PD Health Professionals Follow-Up Study and the Nurses' Health Study USA	Semiquantitative food frequency questionnaire	16 years	High intakes of fruit, vegetables, whole grains, legumes, poultry, and fish were associated with a lower risk of PD.
249	PD Japan	Self-administered diet history questionnaire	6 years	Consumption of omega-3 PUFA, ALA, EPA, DHA was not associated with PD.

Table 1. Prospective observational studies assessing the impact of omega-3 fatty acids supplementation in Parkinson's disease PD patients. (From Avallone et. Al. 2019 [1])

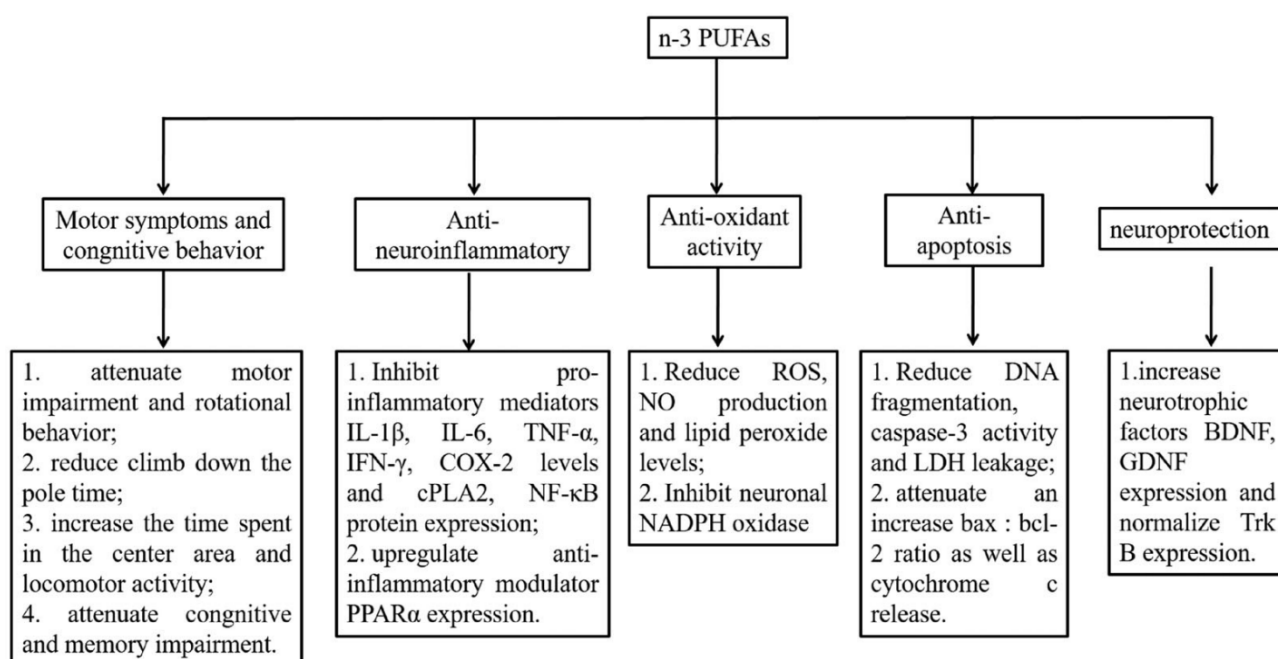


Figure 1. A summary of the mechanism by which n-3 PUFAs treat Parkinson's disease-like changes (Peng Li & Cai Song, 2020)

The bioaccessibility and bioavailability of omega-3 fatty acids, particularly DHA, from krill, algae, and fish oil may differ significantly due to the structural differences in how these oils deliver DHA. Krill oil stores its DHA in the form of phospholipids, which are easily digested and absorbed by the gut, and brain via the MFSD2A pathway [5], [6], [20]. Algae oil typically provides DHA in a triglyceride form, which is the natural form of fat that the body readily absorbs and utilizes. In contrast, fish oil often contains DHA in either triglyceride or ethyl ester forms, the latter being less efficiently absorbed [21]. This difference in the molecular structure can lead to variations in how effectively DHA is delivered to the brain and incorporated into neuronal membranes [5]. Additionally, algae oil is free from the environmental contaminants often found in fish oil, such as heavy metals and PCBs, which can hinder the bioavailability and effectiveness of

omega-3s [22]. In a Parkinson's disease (PD) model induced by rotenone, where neuroinflammation and oxidative stress are key drivers of neurodegeneration, the purer and more efficiently absorbed DHA from algae oil might offer superior neuroprotection compared to fish oil. If more DHA is absorbed by the body, this could more effectively support mitochondrial function, reduce oxidative damage, and maintain neuronal integrity, potentially leading to better outcomes in PD progression. Testing algae oil alongside fish oil in such a model is crucial to determine whether the structural and compositional differences translate into significant variations in therapeutic efficacy, providing clearer insights into the optimal omega-3 source for managing the neurodegenerative Parkinson's disease.

Hypotheses:

- A diet that includes an adequate amount of DHA from an algal source has the same positive effects on Parkinson's disease as fish oil.
- A diet that includes an adequate amount of DHA from krill will decrease Parkinson's disease symptoms to a larger extent than DHA from fish oil and algae oil.

Our hypothesis is based on literature and *in vitro* work where we digested 3 different oils: tuna, algae and krill and measured the percentage bio-accessible DHA. We made sure that all oils had the same amount of DHA by diluting them with sunflower oil. After gas chromatography coupled to a flame ionization detector, we observed that krill oil (mainly DHA in phospholipids) was better digested than tuna and algae oil (mainly TAGs), (Figure 2).

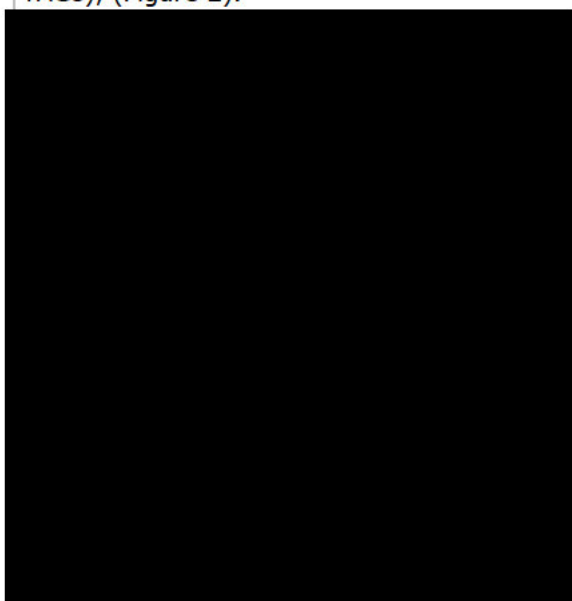


Figure 2. Difference in bio-accessibility of tuna, algae, and krill oil. All oils have the same amount of DHA, digestion was done by INFOGEST with added gastric lipase and co-lipase (n=3).

Different models of PD in mice

Several commonly used mouse models for PD target different pathological mechanisms of the disease, including dopaminergic neurodegeneration, α -synuclein aggregation, mitochondrial dysfunction, and neuroinflammation (Table 2). The oral rotenone model is the most relevant for our study for several reasons:

Mimics Environmental Toxin Exposure: Rotenone is a mitochondrial complex I inhibitor and is a pesticide/herbicide linked to PD in humans. Chronic oral administration models environmental toxin exposure, a known cause of sporadic PD.

Progressive Neurodegeneration: Unlike acute toxin models (e.g., MPTP), oral rotenone induces a slow, progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, more closely resembling the disease course in humans.

α -Synuclein Aggregation: Chronic rotenone exposure promotes α -synuclein misfolding and aggregation, mimicking one of the key pathological hallmarks of PD.

Non-Motor Symptoms: This model also recapitulates some of the early-stage non-motor symptoms of PD, such as gastrointestinal dysfunction and olfactory impairment, which precede motor symptoms in patients.

Peripheral and Central Effects: Oral administration allows systemic effects, including gut-brain axis involvement, which is increasingly recognized as important in PD pathogenesis

Model	PD Features	Chronic or Acute?	Administration	Animal Distress	Pros	Cons
6-OHDA	Neurodegeneration	Acute	Stereotaxic brain injection	High (surgery required)	Rapid and targeted neuron loss, well-established	No α -synuclein pathology, lacks systemic involvement, irreversible
MPTP	Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction	Acute or subchronic	Systemic (intraperitoneal, subcutaneous, or intravenous injection)	Moderate (injection stress, weight loss)	Reproducible, BBB-penetrant, fast induction	Acute damage rather than progressive PD-like degeneration, variable sensitivity
Systemic Rotenone (Injection)	Neurodegeneration, α -synuclein aggregation, mitochondrial dysfunction	Chronic	Brain, subcutaneous, or intravenous injection	High (frequent handling, injection stress, weight loss)	Mimics mitochondrial dysfunction, α -synuclein aggregation	Variable toxicity, invasive, requires repeated dosing
Oral Rotenone	Neurodegeneration, α -synuclein aggregation, mitochondrial dysfunction, gut-brain involvement	Chronic	Oral gavage	Low to moderate (handling stress from gavage, but less than injections)	Chronic neurodegeneration, α -synuclein pathology, systemic effects, non-invasive	Longer disease induction time
α-Synuclein Transgenic	α -Synuclein aggregation	Chronic	Genetic modification	Low	Lewy body-like inclusions, relevant to genetic PD	No robust dopaminergic neurodegeneration, no systemic pathology
Genetic models (LRRK2, PINK1, Parkin KO)	Mitochondrial dysfunction, neurodegeneration (mild)	Chronic	Genetic modification	Low	Models genetic PD pathways	Requires a long time to develop pathology, often mild phenotype
LPS-Induced Inflammation	Neuroinflammation	Acute	Intraperitoneal or intracerebral injection	Moderate to high (depends on dose, injection site)	Strong neuroinflammation, microglial activation	No direct dopaminergic neurodegeneration, not a true PD model

Table 2. Different PD models in mice

Rotenone mouse model

In this research, we will use the oral rotenone model for PD. By administering rotenone orally rather than via injection, the mice will experience less discomfort and this approach reflects a more natural exposure route. The pesticide rotenone is a potent mitochondrial complex I inhibitor that promotes reactive oxygen

species formation. The mitochondrial respiratory chain is vulnerable during PD pathophysiology. Many hallmarks of PD have been replicated in this model, including loss of dopaminergic neurons, alpha-synuclein aggregation, gastrointestinal problems, and changes in gut microbiota composition. Rotenone exposure is known to be associated with an increased risk of developing PD in humans [23]. Therefore, rotenone has shown to be a good candidate to mimic the human PD-like characteristics in animal models and it is well-established in our lab. In case of validity, the model will be sufficient to study the effect of our different omega-3 rich oils (Table 3).

Type of Validity	Pros	Cons
Face Validity	Mimics progressive motor dysfunction (bradykinesia, rigidity, postural instability). Induces some non-motor symptoms (gut dysfunction, anxiety, cognitive deficits).	Symptoms are often milder than in human PD. Less pronounced Lewy body pathology compared to human PD.
Construct Validity	Chronic rotenone exposure leads to mitochondrial dysfunction and oxidative stress, both key mechanisms in PD. Induces dopaminergic neuron loss in the substantia nigra, similar to human PD. Involves gut-brain axis effects, aligning with emerging PD research	Lacks α -synuclein aggregation, a hallmark of human PD. Rotenone toxicity may not fully replicate the complex genetic/environmental interplay in human PD.
Predictive Validity	Sensitive to dopaminergic drugs (L-DOPA, dopamine agonists), making it useful for pharmacological testing. Some neuroprotective compounds (e.g., omega-3s, antioxidants) show expected effects.	L-DOPA response may differ from human PD due to less severe dopaminergic loss. Disease progression is toxin-induced rather than truly neurodegenerative, affecting long-term treatment testing.

Table 3. Types of Validity for the oral rotenone mouse model

The mice will be given different diets to test the effect of the different oils. We will select the most promising oils based on our *in vitro* study. Here is an example of the different diets:

- control diet (no omega-3)
- diet enriched with DHA from fish oil
- diet enriched with DHA from an algal source (*Schizochytrium sp. oil*)
- diet enriched with DHA from an algal source (*Aurantiochytrium sp. oil*)
- diet enriched with DHA from krill oil

Why we cannot do our research *in vitro* or with a human study

Human study: We fully acknowledge the importance of conducting as much research as possible in human models and have indeed planned a human study to investigate the bioavailability and immune-related effects of these omega-3-rich oils. However, there are several key reasons why an animal model remains necessary for addressing our specific research questions: 1. Brain-specific effects cannot be assessed in humans. 2. Our study aims to assess whether different sources of omega-3 PUFAs influence disease progression and neuroinflammatory responses in a rotenone-induced PD model. In humans, such a preventive study would require decades of follow-up, as PD develops over a long period.

***In vitro* models:** We aimed to conduct as much research as possible *in vitro* by developing cell-based models to mimic bodily processes. However, certain aspects cannot be fully replicated *in vitro*, necessitating complementary *in vivo* experiments. *In vitro*, models are especially more difficult to use for us since we want to look at oils as starting material. While *in vitro* digestion models such as INFOGEST, followed by Caco-2 and BBB co-culture models, can provide insights into bio-accessibility and transport mechanisms,

they are challenging for assessing immune effects and unsuitable for assessing neuroprotection. The primary challenge is that the levels of DHA reaching the basolateral compartment after Caco-2 processing are extremely low, making it difficult to induce measurable immune responses in downstream assays. Additionally, the lack of a liver component *in vitro* means that chylomicrons, the primary transport form of DHA post-intestinal absorption, are not properly metabolized into lipoprotein fractions that can cross the blood-brain barrier (BBB). This key metabolic step occurs *in vivo* and is critical for understanding how dietary omega-3s reach the brain. The BBB is very complex. We did not manage yet to build a good model *in vitro*. Current models using cell cultures (with cell lines) have as a problem that omega-3 can travel paracellularly instead of through the cells as happens *in vivo*.

Mouse study for a vegan alternative to fish oil: We acknowledge the paradox of using a mouse model to study a vegan alternative to fish oil. Next to the expected vegan users, we also expect that some users interested in sustainability are not vegan. Furthermore, *in vivo* validation remains essential to assess physiological effects that cannot be fully captured *in vitro*. While sustainability is an important factor, our main goal is to determine whether algae-derived PUFAs are as effective as fish-derived PUFAs in mitigating PD progression. This comparison is crucial, as the structural form of DHA between algae and fish oil can differ. A direct transition to human trials is not feasible because neuroprotection in PD cannot be assessed in healthy volunteers. Unlike bioavailability studies, our research focuses on neuroinflammation and dopaminergic neuron survival—key aspects that require a disease model. Additionally, blood measurements in human trials cannot determine BBB uptake or brain effects, as the liver plays a crucial role in processing omega-3s, affecting their ability to reach the brain. This metabolic step cannot be replicated *in vitro*. Long-term PD trials in humans are also not realistic at this stage, making the mouse model necessary to compare brain uptake and efficacy before selecting the most promising candidate for clinical studies.

Our approach allows us to directly compare fish- and algae-derived DHA in a PD-relevant context, assess neuroinflammation and neuronal survival, and gain mechanistic insights that human trials alone cannot provide. Establishing whether algae-derived omega-3s are a viable alternative requires this *in vivo* step; without it, moving straight to clinical trials would be premature.

References

- [1] R. Avallone, G. Vitale, and M. Bertolotti, "Molecular Sciences Omega-3 Fatty Acids and Neurodegenerative Diseases: New Evidence in Clinical Trials," 2019, doi: 10.3390/ijms20174256.
- [2] T. C. Adarme-Vega, S. R. Thomas-Hall, and P. M. Schenk, "Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 26, pp. 14–18, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.COPBIO.2013.08.003.
- [3] L. Couëdelo *et al.*, "In Vivo Absorption and Lymphatic Bioavailability of Docosahexaenoic Acid from Microalgal Oil According to Its Physical and Chemical Form of Vectorization," *Nutrients* 2024, Vol. 16, Page 1014, vol. 16, no. 7, p. 1014, Mar. 2024, doi: 10.3390/NU16071014.
- [4] D. Sugasini, R. Thomas, P. C. R. Yalagala, L. M. Tai, and P. V. Subbaiah, "Dietary docosahexaenoic acid (DHA) as lysophosphatidylcholine, but not as free acid, enriches brain DHA and improves memory in adult mice," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41598-017-11766-0.
- [5] J. P. Schuchardt, I. Schneider, H. Meyer, J. Neubronner, C. Von Schacky, and A. Hahn, "Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations - a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil," *Lipids Health Dis*, vol. 10, p. 145, 2011, doi: 10.1186/1476-511X-10-145.
- [6] H. Zhang *et al.*, "Characterization of Positional Distribution of Fatty Acids and Triacylglycerol Molecular Compositions of Marine Fish Oils Rich in Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids," *Biomed Res Int*, vol. 2018, p. 3529682, 2018, doi: 10.1155/2018/3529682.
- [7] N. M. Bandarra *et al.*, "Docosahexaenoic acid at the sn-2 position of structured triacylglycerols improved n-3 polyunsaturated fatty acid assimilation in tissues of hamsters," *Nutr Res*, vol. 36, no. 5, pp. 452–463, May 2016, doi: 10.1016/J.NUTRES.2015.12.015.

- [8] J. Iqbal and M. M. Hussain, "Intestinal lipid absorption," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 296, no. 6, p. E1183, Jun. 2009, doi: 10.1152/AJPENDO.90899.2008.
- [9] H. R. Morris, M. G. Spillantini, C. M. Sue, and C. H. Williams-Gray, "The pathogenesis of Parkinson's disease," *Lancet*, vol. 403, no. 10423, pp. 293–304, Jan. 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(23)01478-2.
- [10] D. W. Luchtman, Q. Meng, and C. Song, "Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease," *Behavioural brain research*, vol. 226, no. 2, pp. 386–396, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.BBR.2011.09.033.
- [11] G. Tanriover *et al.*, "The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in bilateral rat model of Parkinson's disease," *Folia Histochem Cytobiol*, vol. 48, no. 3, pp. 434–441, 2010, doi: 10.2478/V10042-010-0047-6.
- [12] A. M. Delattre *et al.*, "Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease," *Neurosci Res*, vol. 66, no. 3, pp. 256–264, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.NEURES.2009.11.006.
- [13] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits," *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 9, pp. 345–381, Mar. 2018, doi: 10.1146/ANNUREV-FOOD-111317-095850.
- [14] M. Bousquet, F. Calon, and F. Cicchetti, "Impact of ω -3 fatty acids in Parkinson's disease," *Ageing Res Rev*, vol. 10, no. 4, pp. 453–463, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.ARR.2011.03.001.
- [15] M. Gómez-Soler, B. Cordobilla, X. Morató, V. Fernández-Dueñas, J. C. Domingo, and F. Ciruela, "Triglyceride form of docosahexaenoic acid mediates neuroprotection in experimental parkinsonism," *Front Neurosci*, vol. 12, no. AUG, p. 343638, Aug. 2018, doi: 10.3389/FNINS.2018.00604/BIBTEX.
- [16] P. Perez-Pardo *et al.*, "Gut–brain and brain–gut axis in Parkinson's disease models: Effects of a uridine and fish oil diet," *Nutr Neurosci*, vol. 21, no. 6, pp. 391–402, Jul. 2018, doi: 10.1080/1028415X.2017.1294555/ASSET/41AA498E-BE6B-4FAD-B9D2-D82FCD7E2603/ASSETS/IMAGES/YNNS_A_1294555_F0005_C.JPG.
- [17] F. Calon and F. Cicchetti, "Future Lipidology Can we prevent Parkinson's disease with n-3 polyunsaturated fatty acids?," 2017, doi: 10.2217/17460875.3.2.133.
- [18] P. Li and C. Song, "Potential treatment of Parkinson's disease with omega-3 polyunsaturated fatty acids," *Nutr Neurosci*, vol. 25, no. 1, pp. 180–191, 2022, doi: 10.1080/1028415X.2020.1735143.
- [19] P. Perez-Pardo *et al.*, "Gut-brain and brain-gut axis in Parkinson's disease models: Effects of a uridine and fish oil diet," *Nutr Neurosci*, vol. 21, no. 6, pp. 391–402, Jul. 2018, doi: 10.1080/1028415X.2017.1294555.
- [20] R. J. Cater *et al.*, "Structural basis of omega-3 fatty acid transport across the blood–brain barrier," *Nature* 2021 595:7866, vol. 595, no. 7866, pp. 315–319, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03650-9.
- [21] L. Couëdelo *et al.*, "In Vivo Absorption and Lymphatic Bioavailability of Docosahexaenoic Acid from Microalgal Oil According to Its Physical and Chemical Form of Vectorization," *Nutrients*, vol. 16, no. 7, Mar. 2024, doi: 10.3390/NU16071014.
- [22] M. Y. Hong, J. Lumibao, P. Mistry, R. Saleh, and E. Hoh, "Fish Oil Contaminated with Persistent Organic Pollutants Reduces Antioxidant Capacity and Induces Oxidative Stress without Affecting Its Capacity to Lower Lipid Concentrations and Systemic Inflammation in Rats," *J Nutr*, vol. 145, no. 5, p. 939, 2015, doi: 10.3945/JN.114.206607.
- [23] C. M. Tanner *et al.*, "Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease," *Environ Health Perspect*, vol. 119, no. 6, p. 866, Jun. 2011, doi: 10.1289/EHP.1002839.
- [24] A. Brodkorb *et al.*, "INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion," *Nature Protocols* 2019 14:4, vol. 14, no. 4, pp. 991–1014, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The primary objective of this project is to evaluate and compare the neuroprotective potential of omega-3 PUFAs derived from fish oil, krill oil, and algae oil in the context of Parkinson's disease (PD). Using a rotenone-induced mouse model of PD, we aim to investigate the extent to which these different omega-3 sources can mitigate hallmark pathological processes, including dopaminergic neuron degeneration in the substantia nigra, chronic neuroinflammation, and oxidative stress.

A central focus of this study lies in the differences in **bioaccessibility**, **bioavailability**, and **molecular form** of docosahexaenoic acid (DHA) across the tested oils — with fish oil primarily providing DHA in triacylglycerol (TAG) form, krill oil in phospholipid (PL) form, and algae oil as TAG or free fatty acid (FFA), depending on the preparation. These differences may influence the efficiency with which DHA crosses the blood-brain barrier and exerts its effects on microglia, astrocytes, and dopaminergic neurons.

Furthermore, by directly comparing these sources within the same experimental system, the study aims to clarify whether algae oil — a vegan and environmentally sustainable alternative — and krill oil can provide comparable or even superior neuroprotective effects relative to traditional fish oil.

Ultimately, this research will contribute to a better mechanistic understanding of how structural differences in omega-3 sources influence their neuroprotective efficacy and whether these alternatives can be recommended as effective nutritional strategies for reducing, delaying, or treating PD progression.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The feasibility of this project is strongly supported by the extensive expertise and track record of our lab and collaborators. Our lab has significant experience with animal models for Parkinson's Disease (PD), particularly the rotenone-induced mouse model. This expertise has resulted in robust outcomes and multiple publications, demonstrating our ability to successfully implement and interpret experiments in this area.

Additionally, we are not working alone. We collaborate with institutions and industry partners, namely: Wageningen University and Research, Danone, Fermentalg, and MicroAlgas Oleas de Mexico. These collaborations provide access to cutting-edge methodologies, specialized expertise, and a network of resources strengthening the project's foundation.

In summary, the combination of our lab's expertise, a strong publication record, and interdisciplinary collaborations with leading partners makes this project highly feasible.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

PD is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease and the risk of developing the disease increases with age. Apart from the typical motor symptoms, PD patients usually suffer from non-motor impairments. Common non-motor problems include sleep disturbances, depression, cognitive deficits, and gastrointestinal impairments. Notably, as indicated by PD patients, the negative effects on the quality of life of the non-motor symptoms exceed the effect of the motor symptoms, highlighting the importance of these often overlooked and undermanaged symptoms.

Currently, there is no treatment for PD restoring the number of dopaminergic neurons in the brain. The most commonly used drug is L-Dopa. It provides dopamine to the brain but it has very strong side effects and no effect on non-motor symptoms. There is an urgent demand for new strategies regarding neuroinflammation and neurodegeneration prevention and treatment. Our experiments could lead to new effective therapies in the treatment of motor and non-motor symptoms.

There is evidence that omega-3 could prevent Parkinson's Disease, but no human studies have tried it as a medicine to treat PD. However, these studies are mostly performed using fish or fish oil. This is not sustainable nor animal-friendly, for this reason, we need to find an alternative. The options for a more sustainable alternative are omega-3-rich algae and krill oil, of which algae oil is the only vegan option. These two oils are not studied concerning PD or other disorders and if we want to replace fish oil, we need evidence that the oils work as well or better in the prevention/treatment of Parkinson's Disease. Although the oils seem promising, there is still little knowledge regarding the bio-accessibility and bio-availability of omega-3-rich algae and krill oils and whether they could replace fish oil.

The integration of animal studies (using robust models) is crucial to better understanding the role of omega-3 from different sources on inflammation in neurodegeneration.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

Society, to prevent Parkinson's Disease. If our research succeeds, we have a lead for a new preventative/therapeutic strategy for PD. Which will potentially better the life of PD patients and family.

Pharmacology Department, Utrecht University, Utrecht. The group studies inflammation in the development of Neurological disorders. New insights could help the group to a better understanding of PD and other neurological disorders.

Food Quality and Design/Food Chemistry/Wageningen Food and Biobased research departments of Wageningen University and Research, Wageningen. These departments study the potential of vegan alternatives for fish oil and will gain insights in the potential of algae and krill oil for replacing omega-3-rich fish oil.

Fermentalg, Libourne, France and Microalgas Oleas de Mexico, San Pedro Tlaquepaque, Mexico. These two companies will deliver the algae oils and will get insight in the potential of their products.

Lab animals, in the interest of the animals we implement the 3 Rs as far as possible (replacement, reduction, refinement).

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

The project's overall strategy is designed to systematically evaluate the potential of omega-3-rich algae and krill oils as sustainable alternatives to fish oil in preventing, delaying symptoms, and treating Parkinson's Disease (PD) (Figure 2). This structured approach combines extensive *in vitro* research with a phased progression of *in vivo* studies. Each phase builds upon the outcomes of the previous one, ensuring an efficient, ethical, and scientifically robust methodology. The project is divided into four interconnected phases with clear objectives, milestones, and decision criteria to guide the progression. The phases are carefully designed to first refine the methodology for animal studies by selecting only the most promising oils. Additionally, the stepwise approach minimizes the number of animals required by discontinuing subsequent phases if a prior phase proves unsuccessful.

Phase I: Extensive *In Vitro* Research

The project begins with a comprehensive *in vitro* investigation to identify algae and krill oils that exhibit equal or superior performance to fish oil. This phase is critical for screening potential candidates without the use of animals and involves multiple experimental approaches:

1. **Chemical Characterization**

The first step is to chemically analyze the composition of each oil. This includes profiling their fatty acid content, focusing on omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) such as DHA and EPA, and analyzing the structure of their triglycerides. These chemical properties are crucial as they influence the oils' bioavailability and physiological effects.

2. **In Vitro Digestion Model**

To simulate the human digestive process, the oils will undergo an *in vitro* digestion assay based on the INFOGEST protocol [24]. This will determine how efficiently the oils are broken down and made bio-accessible for absorption.

3. **In Vitro absorption Cell Model**

Following digestion, the digested oils will be tested in a Caco-2 cell monolayer model, which mimics the intestinal barrier. This model allows us to assess the oils' absorbability and their potential to be transported across the gut lining into the bloodstream.

4. **Blood-Brain Barrier (BBB) Model**

Since PD involves brain degeneration, it is essential to determine if the oils can reach the brain. The digested oils will be tested in a BBB model to evaluate their brain uptake and transport efficiency.

5. **Immune Effects**

Parallel to these absorption studies, the oils will be evaluated for their impact on the immune system. This includes examining their anti-inflammatory and immunomodulatory effects, which are particularly relevant given the role of inflammation in PD. For this, we will use the basolateral Caco-2 medium after absorption of the oil digest, and stimulate with this conditioned media, with and without LPS stimulation, dendritic cells and macrophages.

Coherence and Decision Points:

This phase is essential for narrowing down candidates and ensuring that only the most promising oils proceed to animal studies. Oils that perform similarly to or better than fish oil in all the above assays will be selected for further investigation. Oils that underperform will be excluded, reducing the use of animals in subsequent phases.

The inclusion criteria are:

1. Chemical Characterization: The oil must contain a similar or higher DHA content compared to the fish oil control.
2. In Vitro Digestion: The amount of DHA released after digestion must be similar to or higher than that from the fish oil control.
3. In Vitro Absorption (Caco-2 Model): The amount of DHA absorbed, measured in the basolateral medium after 24 hours, must be similar to or higher than that of the fish oil control.
4. Blood-Brain Barrier (BBB) Model: No inclusion criterion is applied due to the lack of liver metabolism in the *in vitro* setup, which limits accurate modeling of DHA brain uptake.
5. Immune Modulation (Dendritic Cell Assay): Upon exposure to conditioned medium, the IL-12/IL-23 p40 response in dendritic cells must be similar to or lower than that observed with the fish oil control.

Phase II: Prevention Study

Once suitable oils are identified through *in vitro* work, the next step is to investigate their ability to prevent PD symptoms in an animal model. This phase focuses on early intervention to explore whether administering the oils before disease onset can reduce the likelihood or severity of symptoms.

1. **Experimental Design:**

Mice will receive the selected oils before being exposed to rotenone, a neurotoxin commonly used to induce PD-like symptoms. The study will last approximately 10 weeks, during which the oils' protective effects will be assessed.

2. **Assessment of PD Symptoms:**

- **Motor Function:** The rotarod test will be used to assess motor function.

- **Cognitive Function:** Cognitive assessments will measure memory and learning capabilities.
- **Neuroprotection:** Brain tissues will be analyzed post-mortem to assess dopaminergic neuron preservation in regions such as the substantia nigra.

Milestones and Decision Criteria:

Success in this phase is defined by a biologically relevant reduction in both motor and cognitive deficits, as well as the preservation of dopaminergic neurons compared to controls. After this phase, we will evaluate if it is a good idea to move on to the next phase.

Phase III: Late-Onset Study

If the prevention study is successful, the project will move to the late onset setup. This phase investigates whether the oils can delay the progression of PD symptoms when administered at the same time as the rotenone before PD symptoms fully manifest.

1. **Experimental Design:**
Mice will be exposed to rotenone to induce early-stage PD symptoms, simultaneously, the selected oils will be administered, and their ability to slow disease progression will be evaluated over six weeks.
2. **Assessment:**
Similar to the prevention study, motor and cognitive functions will be monitored throughout the experiment. Additionally, post-mortem analyses will examine neuronal loss and inflammation in the brain.

Milestones and Decision Points:

Oils that successfully delay the onset of motor and cognitive impairments, as well as protect neurons, will proceed to the treatment phase. If no effect is observed, we will evaluate if it is a good idea to move on to the next phase.

Phase IV: Treatment Study

The final phase tests whether the oils can reverse or mitigate symptoms in animals with established PD. This phase aims to replicate real-world scenarios where patients seek treatment after symptoms have developed.

1. **Experimental Design:**
Mice will first be exposed to rotenone to induce clear PD symptoms, we expect that the symptoms are present after 3 weeks of rotenone exposure (Figure 2). The oils will then be administered, and their therapeutic effects will be monitored over six weeks.
2. **Assessment:**
Improvements in motor and cognitive functions will be tracked, and post-mortem analyses will evaluate neuronal recovery, reduced inflammation, and other markers of disease reversal.

Milestones and Decision Points:

The primary milestone is observing a biological relevant improvement in PD symptoms and neuronal health compared to untreated controls. If the oils demonstrate therapeutic potential, they could be proposed as potential human therapies.

Coherence of the Project

The phased approach ensures logical progression, with each phase informing the next. By starting with *in vitro* research, the project minimizes animal use and focuses resources on the most promising candidates. Each phase has clear criteria for success, allowing for early termination if an oil fails to meet expectations.

Overall Milestones

1. Completion of *in vitro* screening to identify high-potential oils.

2. Successful prevention of PD symptoms in the prevention study.
3. Demonstration of delayed symptom onset in the late-onset study.
4. Evidence of therapeutic effects in the treatment study.

By following this strategy, the project aims to identify a sustainable omega-3 source capable of preventing, delaying symptoms, and treating PD, while adhering to ethical research principles and reducing reliance on animal studies.

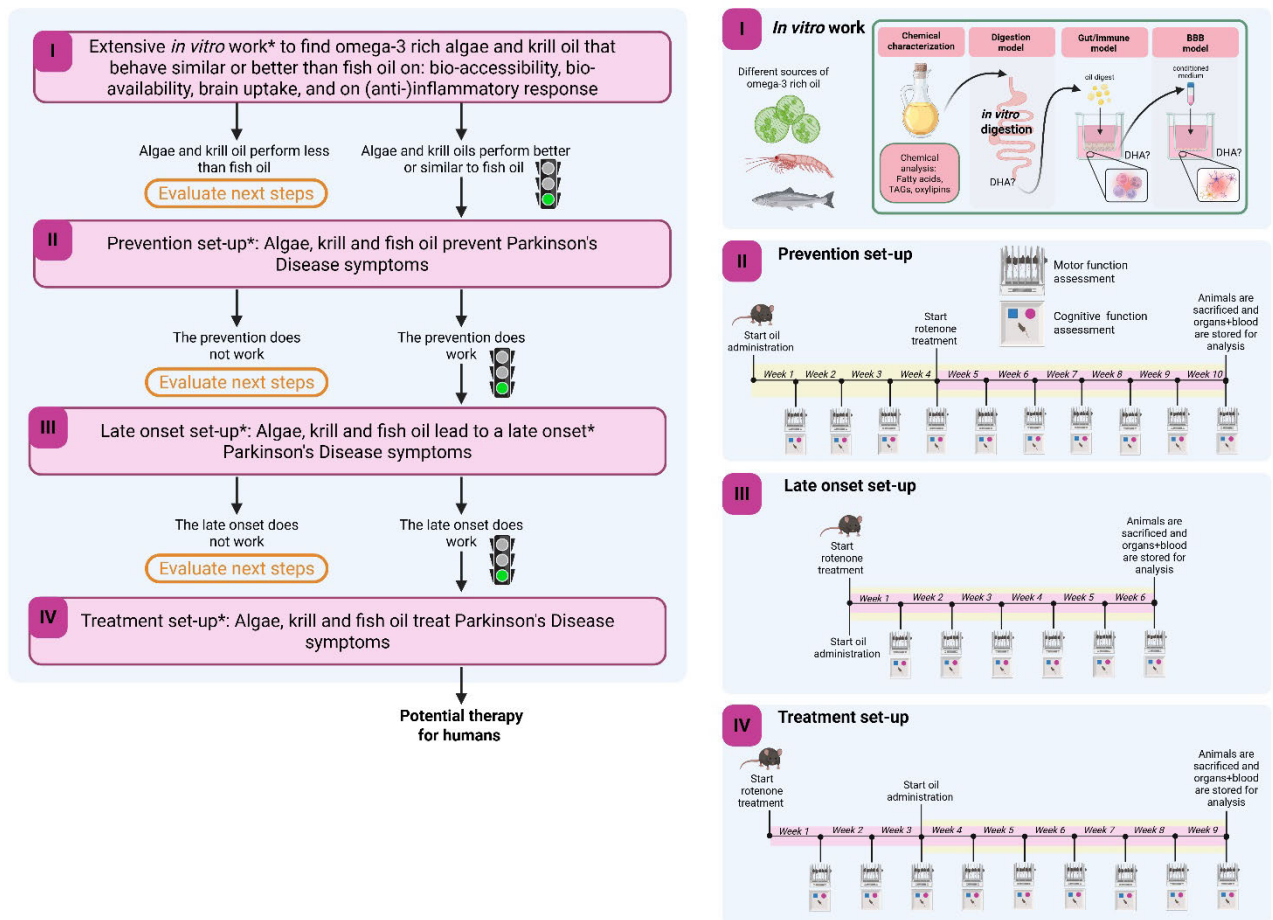


Figure 3. On the left: A decision tree outlining the progression of experiments, where only positive outcomes allow the transition to the next phase, ensuring a systematic and ethical approach. On the right: A schematic overview of the four phases of the study. **Phase I:** In vitro work to chemically characterize algae, krill, and fish oils, assess their bio-accessibility, gut and brain bio-availability, and evaluate their immune-modulating effects. **Phase II:** Prevention setup, where oils are administered for 4 weeks prior to rotenone treatment, followed by 6 weeks of combined oil and rotenone administration. **Phase III:** Late-onset setup, where oil administration and rotenone treatment begin simultaneously and continue for 6 weeks. **Phase IV:** Treatment setup, where rotenone treatment is initiated first. Oil administration begins after 3 weeks, once disease symptoms manifest, and continues alongside rotenone treatment for an additional 6 weeks.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The strategy for this study is carefully designed to ensure that each phase builds upon the results of the previous one, creating a logical and efficient progression of experiments. This phased approach allows for the refinement of methods, reduction in animal use, and generation of scientifically robust data.

The results from **Phase I** (*in vitro* work) will provide essential data for the selection of the most promising oils from algae and krill, based on their chemical characterization, bio-accessibility, gut and brain bio-availability, and immune-modulating effects. These results are critical for refining the experimental design of subsequent *in vivo* studies. Oils that do not meet performance criteria will be excluded, reducing the number of animals needed for later phases.

The outcomes of **Phase II** (prevention study) will demonstrate whether the selected oils can prevent the onset of Parkinson's Disease (PD) symptoms, including improved motor and cognitive function and reduced dopaminergic neuron loss. If prevention proves ineffective, subsequent phases will not be pursued, as it is unlikely that oils unable to prevent PD will succeed in later stages. This stepwise decision-making process ensures ethical and efficient use of resources.

In **Phase III** (late-onset study), the ability of the oils to delay the progression of PD symptoms will be assessed. The results from this phase will indicate whether the oils can intervene in disease development after its initiation, providing additional support for their potential as therapeutic agents. Success in this phase is essential for moving forward to the treatment study.

Finally, **Phase IV** (treatment study) will evaluate whether the oils can mitigate or reverse established PD symptoms. This phase is particularly relevant for translating the findings to human applications, as most PD patients seek treatment after symptom onset.

The stepwise design not only ensures the scientific validity of the study but also allows for the refinement of research methods and ethical use of animals. The oils selected for this study have potential applications beyond PD, given their established roles in other health conditions. By systematically evaluating their efficacy and mechanisms, this strategy facilitates the potential repurposing of sustainable omega-3 sources, accelerating the path toward new treatments for PD while addressing the global need for sustainable alternatives to fish oil.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix 1 Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0800-789 0789).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Utrecht University				
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	<table><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease.</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease.
Serial number	Type of animal procedure				
1	The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease.				

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

We hypothesize that omega-3 fatty acids derived from fish oil, algae oil (*Schizochytrium* sp. and *Aurantiochytrium* sp.), and krill oil exert differential effects on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease (PD). While existing studies have demonstrated the neuroprotective benefits of DHA and EPA, they have predominantly focused on fish oil-derived omega-3s. However, the reliance on fish oil raises significant sustainability concerns, including overfishing and environmental degradation, making it an increasingly unsustainable option. Furthermore, fish oil is unsuitable for vegetarians and certain cultural or dietary preferences.

In contrast, krill and algae oils present promising alternatives. Algae oil, in particular, stands out as a renewable, highly sustainable, and vegetarian-friendly source of DHA. It offers a viable solution for populations with increased omega-3 needs while addressing ecological concerns associated with marine

resource exploitation. This study seeks to fill the gap in knowledge by exploring the efficacy of these alternative omega-3 sources and highlighting the potential of algae oil as a sustainable replacement for fish oil in addressing both nutritional and environmental challenges.

The literature also suggests distinct metabolic fates for different forms of DHA. For example, lysophosphatidylcholine-DHA (LPC-DHA), predominant in krill oil, demonstrates enhanced blood-brain barrier (BBB) penetration compared to triglyceride-bound DHA (TAG-DHA), as found in fish and algae oils. Furthermore, DHA esterified at the sn-2 position of the glycerol backbone, more abundant in algae oil than fish oil, is more efficiently taken up by the brain than DHA at the sn-1/sn-3 positions. Therefore, algae oil may hold greater potential for both preventing and treating PD.

Study Design and Methodology

This study will employ a well-established rotenone-induced mouse model of PD to assess the efficacy of omega-3-rich oils. A preselection of promising vegan omega-3 oils will be made by an *in vitro* study of the chemical form, bio-accessibility, bio-availability **in blood and brain**, and immune function of the oils. Rotenone is a pesticide known to induce PD-like motor and non-motor symptoms, including cognitive impairment and gastrointestinal dysfunction, by disrupting mitochondrial function. Mice will be treated with rotenone (10 mg/kg/day) orally for 6 to 9 weeks to induce PD symptoms. Three experimental paradigms will be used: a preventive approach, in which omega-3-rich oils will be administered for 4 weeks prior to rotenone exposure, a late onset approach where rotenone and omega-3-rich oils will be given at the same time, and a therapeutic approach, where the oils will be introduced 3 weeks after rotenone treatment because it will take three weeks to develop PD symptoms. The different approaches are further elaborated later.

The primary outcome parameters will include an assessment of motor and cognitive performance as an indication of disease progression during the life of the mice. Next to this, we will investigate inflammatory markers in the gut, brain, and blood, DHA/EPA levels in plasma and brain tissue, and BBB integrity. These parameters have been chosen to capture both the neuroprotective and anti-inflammatory effects of omega-3-rich oils, as well as their potential to restore BBB function and improve brain DHA levels, based on previous *in vitro* findings. The oils selected for the study have demonstrated promising neuroprotective effects *in vitro* but have not yet been tested *in vivo* for their therapeutic potential in the context of PD.

Primary outcome parameters:

Motor and cognitive functions

- to be assessed over time with the rotarod and the spatial memory test for mice.

Brain phenotype (post-mortem analysis)

- Dopaminergic cell loss in substantia nigra will be evaluated by immunolabeling of tyrosine hydroxylase of the mice brains using 3D image analysis.
- α -synuclein accumulation by immunostaining of different brain regions Neuroinflammation will be measured by immunolabeling of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (iba-1), a marker for microglial cells, in the mice brains and 3D image analysis. The volume and ramification of the cells will be evaluated since microglia are morphologically and functionally dynamic cells and their activation is associated with an increased cell body size and decreased number of branches, reflecting the morphological transition from a ramified 'resting' to an activated phagocytic proinflammatory phenotype.
- BBB integrity by isolating microvessels from the brains and quantifying tight junction proteins by western blotting
- DHA and EPA volume in the brain using gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID)
- Expression of the transporter Mfsd2a in the BBB

Secondary outcome parameters

Intestinal phenotype

- Intestinal function (intestinal transit time)

- Intestinal barrier integrity: will be assed with immunostaining of the expression of tight junction proteins (Zonula occludens-1)
- α -synuclein accumulation and glial cell activation (glial fibrillary acidic protein, GFAP) by immunostaining in the enteric nervous system.
- Microbiota composition

Peripheral status

- DHA and EPA (omega-3 fatty acids) in plasma using GC-FID
- Oxylin content in plasma using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS)
- Cytokine (such as pro-inflammatory cytokines TNF α or IL-1 β or the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10) levels in plasma using Legend Plex and ELISAs
- T cells will be analyzed in the spleens to get information about peripheral inflammatory status.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Oral rotenone model

Mice are treated via oral gavage (if possible, we will use voluntary oral gavage using a soft tube. Otherwise we will switch to hard gavage needles but we always train the animals to get 'voluntary; gavage) with vehicle (0.5% carboxymethylcellulose) or rotenone (10 mg/kg) daily for 6 weeks. The rotenone dose is based on previous studies where different doses of rotenone were compared on the readout parameter of motor dysfunction. To prevent interference of rotenone with the DHA-rich diet, the rotenone will be given in the morning when the mice are not actively eating.

Omega-3 oral treatment in chow

Treatment with the omega-3 rich oils will start on different moments depending on which study setup we will use. Omega-3 oils will be administered via food. The food pellets will contain the same amount of DHA from the different sources. We will use the standard diet for mice, which can consist of protein, lipids (o.a. soy, coconut, and corn oil), carbohydrates (o.a. corn starch, maltodextrin, sucrose, and dextrose), fibres (o.a. cellulose), and standard mineral and vitamin mixes and additives. For the DHA-rich diets, part of the lipid blend will be replaced by the (diluted) algae, krill, or fish oil containing a total of about 0.75 g/100g diet DHA as previously used. To get the same amount of total oil and total DHA, the oils will be diluted with sunflower oil, before they are homogenized into the food pellets.

Motor function (Rotarod test)

The rotarod test is performed once a week for all the experiments. The rotarod treadmill consists of a plastic rod, with a non-slippery surface, above the base (trip plate). Mice are placed on an accelerating rod with speeds starting with about 2 rpm and gradually increasing to about 20 rpm. The rodent's ability to remain on the rotating rod (time to first fall) will be recorded for a maximum of 5 minutes. Before oil treatment or rotenone (depending on study setup) is started, mice are trained with the rotarod apparatus to rule out learning effects throughout the experiment.

Cognitive function (Spatial memory test)

Animals ability to react to a spatial novelty after a 3 min delay are measured. Mice are individually submitted to five consecutive, 5-min sessions. During session 1 (S1), mice are placed into an empty open field. During sessions 2-4 (S2-S4), five objects are present, and mice are placed into the apparatus to allow them to habituate to the apparatus and to the objects configuration (habituation phase). During the 3-min intersession interval, the animals are then returned to a waiting cage located inside the test room. During the spatial test session (S5), the objects configuration is changed by moving two objects (displaced objects, DO) and leaving the other three objects in the same position (non-displaced objects, NDO). In all sessions, locomotor activity is recorded by counting the number of sector crossings. From sessions 2 to 5, object exploration is evaluated on the basis of the mean time spent by the animal in contact with the different objects. A contact is defined as the snout of the subject actually touching an object. Habituation to objects exploration is assessed by averaging the duration of contacts with the five objects during sessions 2, 3, and 4 in each group. The animals' ability to selectively react to the spatial change is analyzed by calculating the spatial re-exploration index (DO [S5] - DO [S4] = DO and NDO [S5] - NDO [S4] = NDO).

Intestinal transit time

For assessment of intestinal transit time, mice are administered 2,5% Evans blue in a 1.5% methylcellulose solution (0,3 ml per animal) intragastrically through oral gavage, time elapsed between the gavage and stool colored appearance is measured.

At the end of the experiment, all animals are sacrificed by decapitation under anaesthesia for further analysis of the brain, intestinal tract, and spleen. Before the experiments start, we will investigate if other researchers can use other parts of the mice, for example, the heart to investigate the effect of DHA on cardiac health, and freeze what can be used.

Different approaches (Figure 1)

Our study will use three distinct experimental setups to evaluate the effects of algae, krill, and fish oils on Parkinson's Disease (PD). First, we will assess whether these oils can prevent the onset of PD. Next, we will investigate their potential to delay the progression of PD symptoms and the extent of this delay. Finally, we will evaluate the therapeutic efficacy of these oils in treating established PD. The primary distinction between these experimental setups lies in the timing of oil administration relative to disease induction and progression.

- Prevention set-up

Mice will receive the selected oils before being exposed to rotenone, a neurotoxin commonly used to induce PD-like symptoms. The mice will be treated with the omega-3-rich oils 4 weeks prior to rotenone treatment. Based on other studies, we think that the DHA will be incorporated in the brain of the mice in four weeks [1]. Also, we believe that the mice will have an anti-inflammatory effect from the DHA in plasma at this time. The study will last approximately 10 weeks, during which the oils' protective effects will be assessed, by the methods previously mentioned.

- Late onset set-up

If the prevention study is successful, the project will move to the late onset setup. This phase investigates whether the oils can delay the progression of PD symptoms when administered at the same time as the rotenone. For this reason, we will start the rotenone treatment and oil administration at the same time. Normally, the disease onset will be 3 weeks after the rotenone administration, we expect that the oils will delay the start of the symptoms.

- Treatment set-up

The final phase tests whether the oils can reverse or mitigate symptoms in animals with established PD. This phase aims to replicate real-world scenarios where patients seek treatment after symptoms have developed. Based on experience, the mice will show PD symptoms three weeks after start of the rotenone treatment, when the symptoms are present, we will start administering the oils.

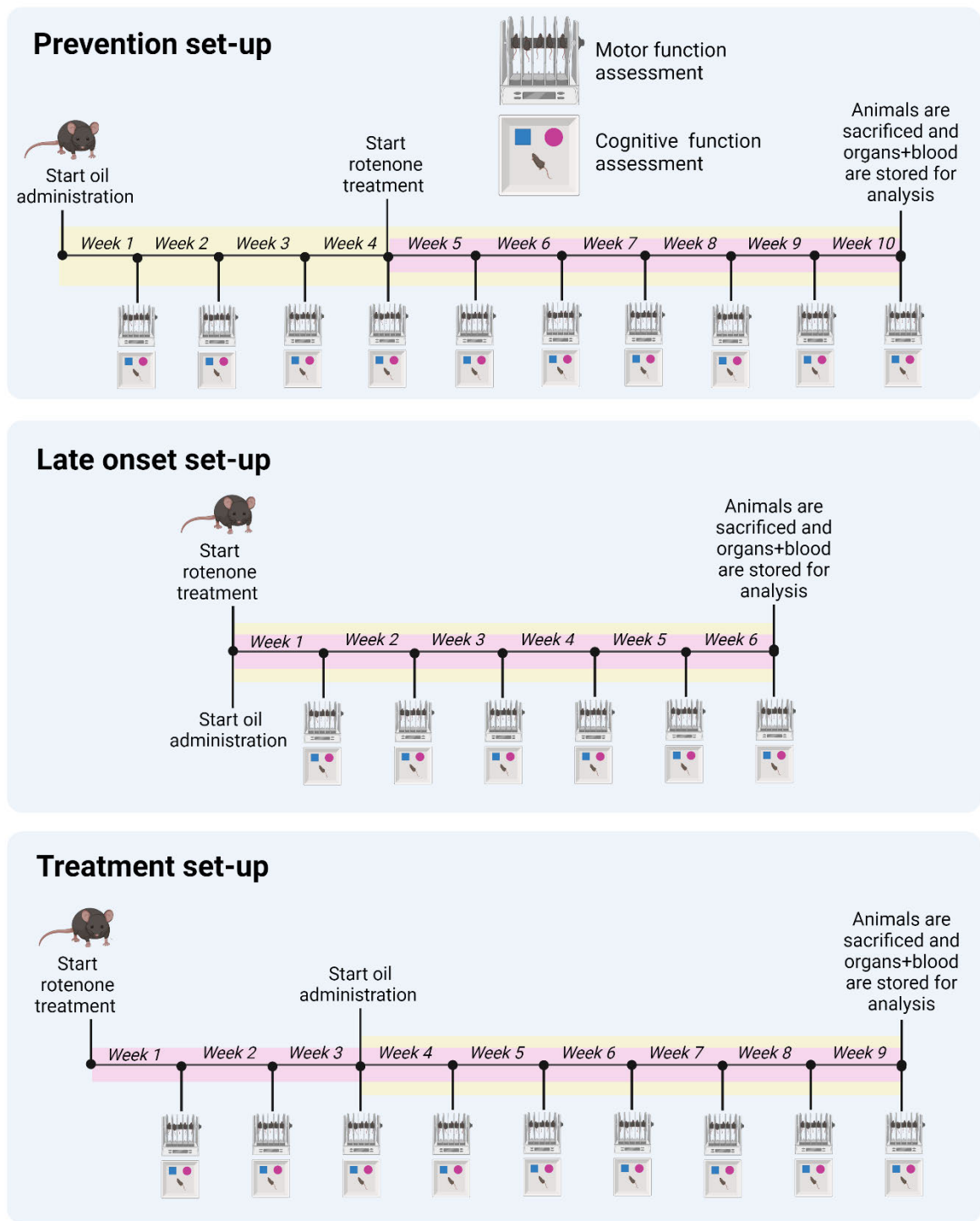


Figure 1: Example of experimental design. A schematic overview of the different designs of the study. **Prevention set-up:** Oils are administered for 4 weeks prior to rotenone treatment, followed by 6 weeks of combined oil and rotenone administration. **Late-onset setup:** Oil administration and rotenone treatment begin simultaneously and continue for 6 weeks. **Treatment setup:** Rotenone treatment is initiated first. Oil administration begins after 3 weeks, once disease symptoms manifest, and continues alongside rotenone treatment for an additional 6 weeks.

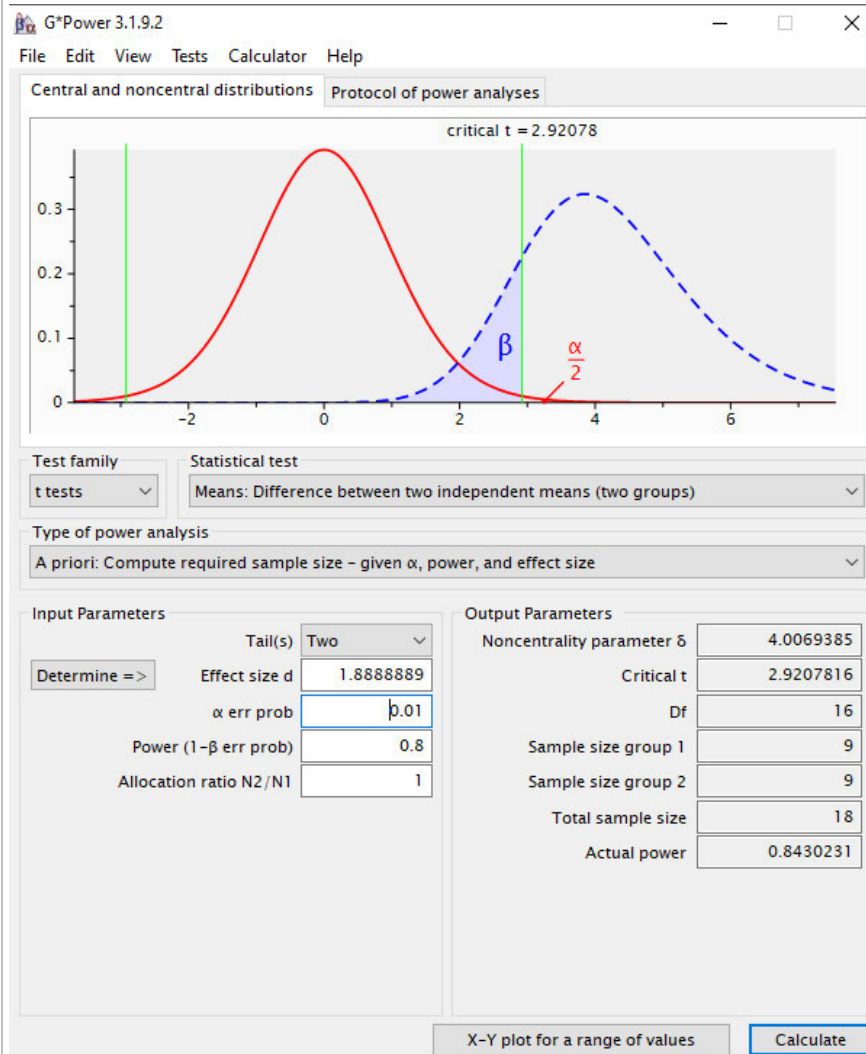
Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Previous studies have shown that the interaction time with the displaced object is the primary outcome that shows the highest variability (cognitive function spatial memory). Therefore, in this experiment, we could determine the desired effect (35 seconds)

Spread in the outcome parameter $SD=18$ seconds.

The effect size was calculated using the data from the differences between groups and the standard deviations (power = 0.8 and alpha = 0.01).

In Gpower we obtain the total sample size of 9.2 animals per group, so this will be 10 animals per group.



The training will be performed before we start the experiments. The objective is to see if we can train the animals for 'voluntary' gavage with soft tubes. During this training period, animals will be gradually acclimatized to the handling and procedures involved, using positive reinforcement where possible to encourage cooperation. If the training proves successful and animals reliably engage in the procedure without signs of distress, this voluntary method will be adopted across all experimental protocols involving gavage.

We will use the standard diet for mice, for the DHA-rich diets, part of the lipid blend will be replaced by the (diluted) algae, krill, or fish oil containing a total of about 0.75 g/100g diet DHA as previously used [2]. To get the same amount of total oil and total DHA, the oils will be diluted with sunflower oil, before they are homogenized into the food pellets.

An example of treatments is shown here, the oils that will be used will depend on the results from the *in vitro* studies.

Prevention Experiment:

- Vehicle treated mice, control diet (no DHA/EPA)
- Vehicle treated mice, fish oil
- Vehicle treated mice, algae oil 1 (*Schizochytrium sp.*)
- Vehicle treated mice, algae oil 2 (*Aurantiochytrium sp.*)
- Vehicle treated mice, krill oil
- Rotenone treated mice, control diet (no DHA/EPA)
- Rotenone treated mice, fish oil
- Rotenone treated mice, algae oil 1 (*Schizochytrium sp.*)
- Rotenone treated mice, algae oil 2 (*Aurantiochytrium sp.*)
- Rotenone treated mice, krill oil

Late onset Experiment:

- Vehicle treated mice, control diet (no DHA/EPA)
- Vehicle treated mice, fish oil
- Vehicle treated mice, algae oil 1 (*Schizochytrium sp.*)
- Vehicle treated mice, algae oil 2 (*Aurantiochytrium sp.*)
- Vehicle treated mice, krill oil
- Rotenone treated mice, control diet (no DHA/EPA)
- Rotenone treated mice, fish oil
- Rotenone treated mice, algae oil 1 (*Schizochytrium sp.*)
- Rotenone treated mice, algae oil 2 (*Aurantiochytrium sp.*)
- Rotenone treated mice, krill oil

Treatment Experiment

- Vehicle treated mice, control diet (no DHA/EPA)
- Vehicle treated mice, fish oil
- Vehicle treated mice, algae oil 1 (*Schizochytrium sp.*)
- Vehicle treated mice, algae oil 2 (*Aurantiochytrium sp.*)
- Vehicle treated mice, krill oil
- Rotenone treated mice, control diet (no DHA/EPA)
- Rotenone treated mice, fish oil
- Rotenone treated mice, algae oil 1 (*Schizochytrium sp.*)
- Rotenone treated mice, algae oil 2 (*Aurantiochytrium sp.*)
- Rotenone treated mice, krill oil

10 x 10 groups x 3 set-ups = maximum 300 animals (minimum 100 animals).

- [1] D. Sugasini, R. Thomas, P. C. R. Yalagala, L. M. Tai, and P. V. Subbaiah, "Dietary docosahexaenoic acid (DHA) as lysophosphatidylcholine, but not as free acid, enriches brain DHA and improves memory in adult mice," *Scientific Reports* 2017 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11766-0.
- [2] P. Perez-Pardo *et al.*, "Gut-brain and brain-gut axis in Parkinson's disease models: Effects of a uridine and fish oil diet," *Nutr Neurosci*, vol. 21, no. 6, pp. 391–402, Jul. 2018, doi: 10.1080/1028415X.2017.1294555.
- [3] M. H. Ullman-Culleré and C. J. Foltz, "Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice," 1999.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	mouse	Registered breeding or	8 week old	300	Males and females	no	C57/Bl6J

		delivery company in the EU				
Provide justifications for these choices						
Species	The rotenone model of PD is validated in this particular species. In addition to motor symptoms, they also develop non-motor symptoms giving a model with high validity for the human situation as discussed in the main proposal form.					
Origin	idem					
Life stages	While Parkinson's disease is primarily an age-related neurodegenerative disorder, we have chosen to use adults (8-week-old) C57BL/6 mice in our rotenone model to ensure experimental consistency and reproducibility. Older mice present significant challenges in this model, including increased susceptibility to systemic toxicity, and higher baseline mortality, which can confound the interpretation of PD-like pathology and reduce statistical power. The rotenone model has a narrow therapeutic window, and younger animals are more tolerant to the compound, allowing for controlled and targeted dopaminergic degeneration without excessive off-target effects. While we acknowledge the limitations in aging representation, the use of young mice allows us to isolate the mechanistic effects of rotenone on mitochondrial dysfunction and neuroinflammation with greater reliability.					
Number	Based on minimum sample size calculation					
Gender	Both males and females since lipid uptake between gender is similar.					
Genetic alterations	na					
Strain	We have used this strain for this model several times before and we saw that animals with this characteristics developed PD-like symptoms, including motor and non-motor symptoms.					

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Animals can experience pain/discomfort as a consequence oral gavages. We will not use painkillers since they can affect major read-out parameters (inflammatory markers).

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken

to ensure that optimal procedures are used.

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

No adverse effects are expected due to the omega-3 administration. Adverse effect may happen after oral rotenone treatment: animals that have received oral gavages with rotenone will develop motor-problems. Notably, strength loss in the limbs just like Parkinson's disease patients.

Explain why these effects may emerge.

The symptoms develop because of oral rotenone exposure, resulting in dopaminergic cell loss in the substantia nigra.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The dosage used for this experiment is based upon previous research. It is the lowest dose sufficient to induce changes in motor function, but not lead to debilitating disease. If animals are seen to show diminished welfare as a result of the motor symptoms, then food can be added directly to the cage to ensure they receive adequate food.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General clinical signs (fur condition, posture, behavior, etc.) are observed daily if animals show signs of discomfort they will be weighted daily. When body weight loss is more than 15% within 2 days animals will be euthanized.

Next to the general signs, these are the specific clinical signs we will look for in our mice:

Specific clinical signs:

Human end points for esophageal damage specific for mice undergoing repeated oral gavage:

- Persistent or severe respiratory distress (gasping, noisy breathing, or labored breathing that does not resolve within 15 minutes).
- Esophageal rupture or leakage, diagnosed by swelling of the neck or under the forelimbs.
- Inability to eat or drink. Diagnosed using the body condition score and HEP at a score of 1 [3].

Humane end points for rotenone treatment and as a consequence of the PD:

- Inability to eat or drink. Diagnosed using the body condition score and HEP at a score of 1 [3].
- Severe motor dysfunction: Diagnosed using the rotarod, and HEP if they cannot stand by themselves on the rotarod. (The rotarod will be used during the experiment; no extra rotarod will be done.)
- Paralysis: inability to move certain limbs (not seen before in our model)

Indicate the likely incidence.

In our experience the likely incidence of reaching human endpoint is <2%. (AVD108002016643)

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Daily oral gavages during rotenone treatment period and training period: moderate.

Development of PD-like symptoms in mice receiving rotenone gavage: moderate, in maximal 50% of the total mice (vehicle treated mice do not develop PD-like symptoms).

Motor function tests: mild

Cognition test: mild

Transit time test: mild

Based on the accumulation of the discomfort induced by described procedures and the duration of the experiments we estimate the discomfort to category moderate for all animals.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement	<p>Within this study, we and our collaborators will perform studies <i>in vitro</i> and during a human trial. In the human trial, participants will get omega-3 from fish or algae and we will look at bio-availability and immune functioning. Unfortunately, we can only do a study in healthy humans and not in PD patients. The <i>in vitro</i> work we did and will do includes chemical characterization of the oils, <i>in vitro</i> digestion of the oils, absorption of the oils through the gut and brain using cell culture and immune experiments. These experiments are for now not enough to prove the ability of algae oil to completely replace fish oil. However, with the use of the mice study we hope to validate our <i>in vitro</i> findings, so future research can be done by our models replacing current animal models. Unfortunately, replacement is not totally possible for all the experiments. To examine the digestibility, absorption, ability of omega-3 to cross the blood-brain barrier and immunologic effects of omega-3 from different sources whole animal studies are essential. The effects of different sources of omega-3 can only be tested in laboratory animals. To examine the role of omega-3 from different sources, the whole animal studies are essential using oral rotenone treatment. This model is well established in our group and significant and reliable results regarding motor dysfunction, cognitive impairment and intestinal dysfunction have been assessed.</p>
Reduction	<p>We will only use the minimum sample size calculated with power analysis. Furthermore, we will test multiple parameters on the animals, thereby reducing the number of animals. We hope to use all animals for publication purpose.</p>
Refinement	<p>From previous experience with this animal model, we have found that it could be worthwhile to train the mice to the high volume of gavages performed. The training involves accustoming the animals to repeated handling and the introduction of (soft) tubes into their mouths/esophagus/stomach. By performing this from an early age, they will experience reduced discomfort from the repeated gavage that will be performed throughout the duration of the study. If the training fails, we will switch to alternative options for the oral gavages. Our animals are housed in groups in an enriched environment. We chose behavioral experiments (novel recognition test) that are not invasive for the welfare of the animals.</p>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

Residues from the cages of the animals treated with pesticide rotenone will be put in special containers to avoid environmental pollution.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

We need to collect several organs for analysis, including, brain, spleen, intestines.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Decapitation under anaesthesia, as described in annex IV of directive 2010/63/EU.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD10800202518822
2. Titel van het project : The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease
3. Titel van de NTS : Het effect van Omega-3 op de preventie, vertraging en genezing van de ziekte van Parkinson

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 28-03-2025
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 02-04-2025 en 07-05-2025
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot: 08-04-2025 / 25-04-2025
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 14-05-2025

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 02-04-2025
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 6
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over het doel van het project, de humane studies, het *in vitro* onderzoek en microbionica. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 08-04-2025
- Datum antwoord: 25-04-2025
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond: U heeft al uitgebreid *in vitro* onderzoek naar oliën gedaan. U heeft enkele oliën geselecteerd voor *in vivo* onderzoek. Kunt u de entreecriteria voor deze selectie duidelijk benoemen: welke parameters zijn gehanteerd, en wat zijn de go/no go-criteria geweest?

Beste leden van de DEC, bedankt voor de vraag. Wij zijn nog steeds bezig met de in vitro onderzoeken en hebben nog geen oliën gekozen. We hebben wel criteria waaraan de oliën moeten voldoen en er zijn al een aantal oliën afgevallen. Wij hebben de criteria toegevoegd aan het project voorstel, 3.4 Strategy.

Is er voldoende onderbouwing dat omega-3 echt iets positiefs doet tegen Parkinson? Niet al uw referenties bieden een stevige onderbouwing hiervan.

Er zijn ook *systematic reviews* die juist een heel wisselend beeld laten zien. Kunt u hierop reflecteren en duidelijk aangeven hoe u de belangrijkste en meest actuele referenties op dit gebied evalueert?

*Het is inderdaad lastig om uit algemeen humaan uitgevoerde literatuur te halen of omega-3 echt een positief effect heeft op de ziekte van Parkinson. Mensen kunnen wel gevolgd worden en ze kunnen aangeven wat ze eten, hieruit kan je zien welke deelnemers veel omega-3 binnen krijgen en welke minder en dit correleren aan het ziekteverloop (zie Table 1 hieronder weergegeven). Het is moeilijk om te concluderen of de omega-3 inname leidt tot positieve effecten op PD of dat mensen die vaker vis eten over het algemeen gezonder leven en hierdoor voordelen ervaren er zit daarmee mogelijk veel bias in humane correlatie studie. Wij vinden het onethisch om een humane studie uit te voeren die wel **gecontroleerd** is en waar de helft van de deelnemers omega-3 mag slikken (of eten in de vorm van vis) en de andere helft geen toegang heeft tot dit potentieel voordelige en effectieve supplement.*

Wij hebben om deze reden wel referenties naar humane studies toegevoegd, maar of het effect echt door omega-3 komt is ons inziens alleen te onderzoeken in een gecontroleerd diermodel. De effecten in diermodellen zijn veel belovend. We hebben dit in de tekst geel gemarkeerd.

U vermeldt kort de transporter in de bloed-hersenbarrière (Mfsd2a pathway). Vetzuren veroorzaken overexpressie van deze receptor waardoor het transport van omega-3 vetzuren over de bloed-hersenbarrière mogelijk wordt. Dit (met name de expressie van Mfsd2a receptoren) is experimenteel goed meetbaar. Test u dit ook of heeft u dit ook getest *in vitro*? Kunt u dit meer toelichten, aangezien deze transporter een verband heeft met Parkinson en mogelijk als robuuste parameter kan gelden?

Dit is inderdaad een belangrijke transporter voor ons onderzoek en kan interessant zijn om te meten. In vitro hebben wij hier nog niet naar gekeken. Wij hebben dit opgenomen in de appendix om te onderzoeken: Expression of the transporter Mfsd2a in the BBB.

U heeft aangegeven met dit onderzoek na te willen gaan of andere, meer duurzame bronnen van omega-3 vetzuren, zoals algen- of krillolie, dezelfde positieve effecten kunnen hebben als visolie op neuro-inflammatoire ziekten, waarbij gekozen is om te testen op Parkinson.

Waarom heeft u specifiek voor het Parkinsonmodel gekozen?

Wij hebben specifiek gekozen voor het Parkinsonmodel omdat er sterke aanwijzingen zijn dat neuro-inflammatie een cruciale rol speelt in de progressie van PD. In dit model kunnen we het effect van omega-3 vetzuren op neuro-inflammatoire processen, zoals neurodegeneratie en activatie van microglia, goed bestuderen. Door dit model te gebruiken kunnen we dus niet alleen kijken naar algemene anti-inflammatoire effecten, maar ook naar de potentie van deze duurzame omega-3 bronnen in het vertragen of voorkomen van neurodegeneratie.

Daarnaast is de ziekte van Parkinson sterk geassocieerd met verstoringen in de darm-hersen-as. Er zijn aanwijzingen dat pathologische veranderingen bij Parkinson mogelijk in de darmen beginnen, en naar de hersenen verspreiden. Omdat onze omega-3 oraal wordt toegediend, is dit model geschikt om de effecten op zowel de darmgezondheid als de hersenfunctie te bestuderen binnen één opzet. Wij verwachten dat omega-3 een positieve invloed heeft op het verloop van PD, maar we verwachten dat dit verbeterd kan worden door te kijken naar andere vormen die potentieel meer bio-beschikbaar zijn in darm en brein.

Tot slot is er momenteel nog geen genezende behandeling beschikbaar voor de ziekte van Parkinson. Het onderzoeken van nieuwe, preventieve of vertraging biedende strategieën – zoals het inzetten van duurzame omega-3 vetzuren – is daarom van groot belang.

U wilt ook een humane studie doen (maar niet met Parkinson). Welke kinetische parameters van de mens zijn reeds bekend?

Van DHA en EPA zijn bij gezonde mensen al diverse kinetische parameters bekend, zoals absorptie, plasmaconcentraties, halfwaardetijd en opname in organen zoals de hersenen, vooral na langdurige supplement gebruik. Deze gegevens zijn vooral gebaseerd op visolie, maar er is ook toenemende literatuur over algen- en krillolie.

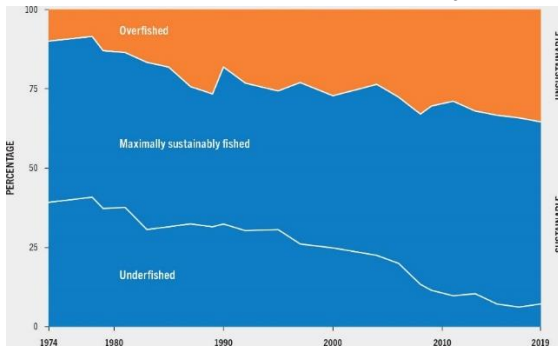
Zou het onderzoek naar de vergelijking tussen visolie en de alternatieven ook zonder ziektemodel kunnen?

*Ja, de vergelijking tussen visolie en alternatieven zou ook zonder ziektemodel kunnen, bijvoorbeeld door te kijken naar opname, verdeling en acute effecten op inflammatoire markers. Echter, een ziektemodel zoals Parkinson is essentieel aanvullend om de **functionele relevantie** van deze vetzuren op neuro-inflammatie en neurodegeneratie daadwerkelijk te beoordelen, terwijl we voorheen genoemde parameters eveneens mee nemen.*

Een van de redenen dat u algenolie en krill als vervanger van visolie wilt onderzoeken is dat er druk staat op de visstand waardoor er niet genoeg vis zal zijn om visolie te maken. De visstand neemt af. Kunt u dit (en daardoor het gewicht van dit argument) met cijfers onderbouwen?

De Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) heeft een overzicht gemaakt van hoeveel procent van de visvangst sustainable is en hoeveel procent unsustainable (hoog) of terwijl 'overfished' is. In 2019 was slechts 64,6% sustainable en de rest had niet gevangen

moeten worden. *The status of fishery resources*



Om dit ook in het proposal duidelijk te maken hebben wij een regel toegevoegd aan '3.1 Background': In 2019, only 64,6% of the total fish catch was sustainable, with the remaining percentage being overfished according to the Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

U noemt veganisten als degenen die geen visolie in willen innemen en dus behoefte hebben aan een alternatief. Neemt u in uw overwegingen mee dat consequente veganisten ook niet zouden willen dat er dierproeven worden gedaan voor alternatieven (als ze dit zouden weten)?

Naast dat veganisten niet onze enige doelgroep zijn, zijn wij van mening dat veganisten ook recht hebben op een medicijn als ze PD krijgen. We hebben onze redenering hiervoor in de tekst geel gekleurd.

Natuurlijke producten, zoals algen, hebben geen vaste samenstelling, waardoor een consistente werking moeilijk aantoonbaar is. Bevatten de algen over b.v. 5 jaar nog dezelfde werkzame stoffen en in dezelfde verhouding?

*Hoewel natuurlijke producten zoals algen theoretisch in samenstelling kunnen variëren, wordt commerciële productie van algenolie uitgevoerd onder strikt gecontroleerde omstandigheden (zoals fermentatie in bioreactoren), waarbij onder andere temperatuur, nutriëntengehalte en groeifase optimaal worden afgestemd. Hierdoor is het mogelijk om een zeer consistente olie te produceren met een gestandaardiseerd gehalte aan omega-3 vetzuren (zoals DHA en EPA). De algensoort (bijv. Schizochytrium sp.) wordt bovendien in stabiele laboratoriumculturen bewaard, waardoor genetische drift of variatie minimaal is. In tegenstelling tot wat men vaak denkt, is algenolie in de praktijk vaak **consistenter** dan visolie, waarvan de samenstelling afhankelijk is van vissoort, seizoen, locatie en vervuiling (zoals zware metalen).*

Daarom verwachten wij dat algenolie ook over vijf jaar nog dezelfde werkzame stoffen bevat, in gelijke verhouding, mits afkomstig van een betrouwbare producent.

Bedankt voor deze tip, we hebben dit ook toegevoegd aan het project voorstel bij 3.1 Background.

Kunt u reflecteren op hoe uw onderzoek solide bewijs zal leveren dat het werkelijk de (omega-3)vetzuren zijn die het eventuele aangetoonde effect veroorzaken?

In de muizenstudie worden de oliën via orale toediening gegeven, waarbij we zorgvuldig gecontroleerde doseringen gebruiken met een gelijkwaardig DHA-gehalte tussen de groepen. We maken gebruik van meerdere oliebronnen (vis-, algen- en krillolie) om te onderzoeken of het effect specifiek toe te schrijven is aan de omega-3 vetzuren, en niet aan andere

oliecomponenten.

Door alle dieren een identieke hoeveelheid DHA te geven, kunnen we verschillen in effect (bijvoorbeeld op motoriek, neuro-inflammatie of dopaminerge degeneratie) direct koppelen aan de vorm en bron van de omega-3 vetzuren. Bovendien nemen we hersenweefsel en bloed af om het DHA-gehalte in relevante organen te analyseren. Zo kunnen we bevestigen dat het actieve bestanddeel (DHA) daadwerkelijk is opgenomen en in verband brengen met het waargenomen biologische effect.

Deze aanpak zorgt ervoor dat we solide en reproduceerbaar bewijs kunnen leveren dat het effect toe te schrijven is aan de omega-3 vetzuren zelf, ook in een complex in vivo model zoals Parkinson.

Tabel 3: Onder Construct Validity noemt u bij Pros: "Involves gut-brain axis effects, aligning with emerging PD research". Het is al aangetoond dat DHA een positief effect heeft op de samenstelling van de microbiota en de gut-brain axis bij muizen met een rotenone-induced PD. Het zou voor de voortgang van het PD-onderzoek van belang zijn als u dit eventuele effect van de door u gebruikte oliën zou meenemen in uw onderzoek. Wilt u dit overwegen?

Thank you for this idea! Alterations in gut microbiota composition have been linked to immune dysregulation in Parkinson's disease, including increased pro-inflammatory cytokine levels. These immune changes may contribute to the misfolding and aggregation of alpha-synuclein, a hallmark of Parkinson's pathology, suggesting a potential gut-immune-brain axis in disease progression. Therefore, it is of interest to measure it in addition to the already mentioned intestinal phenotype features. We added this parameter to: 'A. Experimental approach and primary outcome parameters'.

3.2 Doel: Kunt u het doel van het project beter omschrijven?

Wij hebben het doel uitgebreider beschreven.

Zijn er aanwijzingen op basis van de compositie (scheikundige metingen) van de verschillende oliën dat de hypothese valide is? Kunt u de aanwijzingen vermelden?

Wij hebben gezien als we onze oliën zo verdunnen dat elke olie evenveel DHA bevat (alleen de bron is anders), de krill olie beter verteerd wordt dan de tonijn en algen olie. De tonijn en algen olie verteren op dezelfde manier. De tonijn en algen olie bestaan vooral uit TAGs en de krill olie uit fosfolipiden. In de tekst hebben wij de grafiek toegevoegd.

U gaat de bio-equivalentie testen tussen verschillende producten. De standaard is DHA. Kunt u in meer detail aangeven welke parameters (kinetiek en dynamiek) van DHA als uitgangspunt voor het aantonen van bio-equivalentie worden gehanteerd?

DHA, the reference compound in our study, is typically derived from fish oil in the form of triacylglycerol (TAG-DHA). The alternative products being tested—such as algal DHA—are also in the TAG form, ensuring a comparable molecular structure. Although algal oil generally contains a higher concentration of DHA compared to fish oil, this difference in composition is accounted for in our human studies through dose correction. Similarly, for the current animal study, any potential differences in DHA dose will be normalized in the analysis phase using correction factors, should direct comparisons between forms be required.

From a pharmacokinetic (PK) perspective, DHA uptake can vary slightly between sources. For

instance, krill oil may result in higher bioavailability. However, in this particular study, our focus is not primarily on PK parameters such as C_{max} or AUC. While such data can be collected through serial blood sampling, as is done in our human studies, our main objective here is to assess bioequivalence based on pharmacodynamic (PD) outcomes.

Therefore, the emphasis lies on pharmacodynamic parameters that reflect DHA's biological activity. These include:

Changes in inflammation markers

Behavioral outcomes

DHA incorporation in plasma, brain tissue.

These PD endpoints provide a more direct assessment of the functional impact of different DHA sources, aligning with the primary aim of our study.

In de NTS vermeldt u dat het project 6 maanden duurt. De vergunning vraagt u voor 5 jaar aan. Kunt u de duur van het project en de experimenten daarbinnen verduidelijken?

Dit is inderdaad een fout van ons, het project duurt 5 jaar. In de NTS is dit aangepast naar 60 maanden.

U benoemt als stakeholders buitenlandse bedrijven die algen en krill voor het onderzoek beschikbaar zullen stellen. Kunt u aangeven of deze bedrijven een commercieel belang hebben bij de uitkomsten van dit onderzoek? U heeft aangegeven dat dit onderzoek vanuit de 1^e geldstroom gefinancierd wordt. Klopt dit, of financieren deze partijen het project direct of indirect ('in kind') mee (3^e geldstroom)?

Dit is inderdaad een fout van ons, wij hebben ook geldstroom uit derde met een 'in kind' contributie (Bedrijven en TKI).

Als een middel preventief niet werkt, maar therapeutisch wel zou werken, dan is het niet verstandig om bij een negatieve uitkomst in de preventieve test een no-go toe te passen voor een sequentieel onderzoek naar een therapeutische effect. Worden mogelijke preventieve en therapeutische effecten onafhankelijk van elkaar onderzocht?

Kunt u in dit kader aangeven op basis waarvan de no-go's zijn gebaseerd in dit project?

We zien het punt van de DEC, als een middel niet preventief werkt zou het in theorie wel therapeutisch kunnen werken. Onze gedachte gang was dat de tijd dat omega-3 heeft om de hersenen te bereiken, bij de preventieve set up, langer is dan bij de therapeutische set-up en daarom meer kans van slagen heeft. Dit hoeft inderdaad niet zo te zijn. In de tekst zullen we de no-go's vervangen door evaluatie momenten. Na elke experimentele set-up zullen we evalueren of we meerwaarde zien van een vervolgstudie in plaats van het stoppen van het onderzoek bij een negatieve uitkomst.

Kunt u onderbouwen hoe u tot set-up II, III en IV gekomen bent? Kunt u de meerwaarde van de late onset set-up in het geheel verduidelijken?

Op basis van eerdere onderzoeken (in literatuur) weten wij dat DHA in 4 weken de hersenen bereiken en tijd heeft om te incorporeren in de brein cellen. Daarom willen wij in de preventieve set-up (II) de muizen 4 weken van te voren omega-3 toe dienen voordat wij beginnen met de rotenon behandeling.

In de late onset set-up (III) willen wij testen of muizen later PD symptomen ervaren wanneer ze omega-3 krijgen tegelijk met de rotenon. Dit zou transleren naar patiënten die een hogere

kans hebben om PD te ontwikkelen, of patiënten waar een dokter PD voorspelt maar nog geen symptomen kan ontdekken. Wanneer een dokter dit opmerkt, zou deze gelijk omega-3 kunnen voorschrijven om de PD symptomen zo lang mogelijk uit te stellen. Voor de treatment set-up wachten wij totdat we duidelijke PD symptomen zien in de muizen, naar ervaring is dit 3 weken na het begin van rotenon. Wanneer wij symptomen waarnemen beginnen wij met de omega-3 supplementatie, zodat dit als medicijn dient.

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Kunt u verduidelijken waarom alle controles opnieuw in alle experimenten worden meegenomen, en in dezelfde groepsgrootte uitgevoerd worden? Ziet u mogelijkheden om hier minder dieren voor te gebruiken door kleinere groepsgroottes?

Elke studie is net anders en daarom hebben we alle controles opnieuw nodig, anders kunnen we onze uitkomsten niet vergelijken. Wij gaan een powercalculatie doen om nog te kijken welke groepsgrote nodig is.

U geeft aan 10 tot 15 dieren per groep nodig te hebben. Hiervoor is vooraf geen powerberekening gemaakt, terwijl de benodigde informatie voor de berekening wel beschikbaar is. Kunt u het aantal dieren onderbouwen?

Wij hebben zelf een power calculatie gedaan. Ons werd aangeraden bij de IvD om deze uit de appendix te halen en later een statisticus in te schakelen om de power calculatie te doen. Dit omdat statistiek niet mijn expertise is. Dit is de power calculatie die wij zelf hebben gedaan, om fouten te kunnen corrigeren hebben wij 10 tot 15 dieren per groep aangevraagd. Wij gaan uiteraard het minimum aantal dieren dat we nodig hebben volgens de powercalculatie (door de statisticus) gebruiken. Wij hebben dit in de appendix toegevoegd.

U geeft aan 50 dieren nodig te hebben voor training. Kunt u onderbouwen waarom u hiervoor dit aantal dieren nodig heeft? Kunt u het aantal dieren voor trainingsdoeleinden tevens in de NTS opnemen?

We hebben een verduidelijking toegevoegd aan 'A. Experimental approach and primary outcome parameters'. De training wordt gedaan op de dieren die we gebruiken in de experimenten, dus de 50 extra dieren zijn niet voor training. De 50 extra dieren zijn voor het geval dat onze statistici een andere power berekend dan wij, de biologische variatie net iets groter is en voor eventuele pilot experimenten.

B. De dieren: Kunt u verduidelijken waarom u 8 weken oude muizen gebruikt, terwijl u onderzoek doet ten behoeve van oudere Parkinsonpatiënten?

We hebben een verduidelijking toegevoegd aan 'B. animals'.

F. Classificatie van ongerief:

Kunt u beschrijven welk ongerief (effect op de darmen) de muizen hebben door orale toediening van rotenon?

Op ons lab wordt al 10 jaar gebruik gemaakt van het orale rotenon model. Wij zien hier geen ongerief dat door de darmen komt.

Kunt u aangeven wat het effect is van het microbioom in het maag-darm-stelsel, het effect van rotenon hierop en het effect op de ziekteverschijnselen, de humane eindpunten en de

ongeriefclassificatie?

Wij verwachten dat rotenon het microbioom zal beïnvloeden. Echter zal het ongerief wat wij verwachten komen door het effect van de neuron degeneratie waardoor de muizen wat trilling krijgen in hun poten. Het meeste ongerief wordt verwacht doordat de herhaaldelijke orale gavage onprettig kan zijn voor de muizen.

G. Vervanging, vermindering en verfijning: Kunt u verduidelijken wat u bedoelt met 'geen dierstudies nodig'?

Wij zijn druk bezig met het opzetten en uitvoeren van in vitro modellen voor de vergelijking van de verschillende oliën. Wij weten niet zeker of deze modellen goed voorspellen wat er in vivo zou gebeuren. Wij vertrouwen er wel erg in dat onze modellen goede resultaten geven en we hopen dat we met de dierstudie ook onze modellen kunnen valideren. Uit de dierstudie hopen wij biomarkers te halen waarmee we onze in vitro proeven kunnen optimaliseren. Als wij bewijzen dat onze in vitro modellen valide zijn, kunnen andere onderzoekers in de toekomst onze in vitro modellen gebruiken i.p.v. een dierstudie.

Niet Technische Samenvatting

Het woord "bestrijdingsmiddel" is suggestief. Rotenon is in de EU al lang volledig verboden als 'bestrijdingsmiddel'. Het algemene publiek – waarvoor de NTS bestemd is - kan geen onderscheid maken tussen rotenon als chemische stof die experimenteel wordt toegepast om Parkinson te induceren of rotenon dat wordt toegepast als bestrijdingsmiddel waardoor humane blootstelling veroorzaakt zou kunnen worden. Dat laatste is in de westerse wereld al lang niet meer mogelijk en daarom zou een wat zorgvuldiger formulering passend zijn. Wilt u een andere formulering overwegen?

In de tekst hebben wij dit aangepast naar 'chemische stof' in '22 In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt'.

Kunt u de zin 'Op de lange termijn kan dit project bijdragen aan betere behandelingen en strategieën om de ziekte te voorkomen voor mensen met Parkinson of mensen met een verhoogd risico op deze ziekte' herzien? De zin klopt niet (hoe kun je een ziekte voorkomen voor mensen met de ziekte?) en suggereert mogelijk een te grote belofte.

De zin klopt inderdaad niet. Wij hebben hem veranderd in de tekst naar:

Op de lange termijn kan dit project bijdragen aan betere behandelingen voor de ziekte van Parkinson en bijdragen aan strategieën om de ziekte te voorkomen.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het betreft een project waarin voor visolie (als bron van omega-3 vetzuren) even effectieve maar duurzamere alternatieven zoals krillolie en algenolie worden onderzocht voor preventie en behandeling van de ziekte van Parkinson (PD). De huidige hypothese is dat dit preventief en mogelijk curatief kan werken tegen Parkinson. De werking wordt onderzocht in een standaard rotenonmodel in jongvolwassen muizen.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie, te weten translationeel onderzoek, sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is in muizen te onderzoeken of andere, meer duurzame bronnen van omega-3 vetzuren, zoals algen- of krillolie, dezelfde effecten kunnen hebben als visolie op neuro-inflammatoire ziekten, waarbij gekozen is om te testen op de ziekte van Parkinson. Het uiteindelijke doel van het project is gebruikers van visolie als supplement een even effectief en duurzamer alternatief te kunnen bieden. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het neurologische onderzoeksveld en de behoeften vanuit de maatschappij (duurzaam en veganistisch).
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, mensen die preventief aan gezondheid willen werken, maatschappij, onderzoekers en leveranciers oliën. De proefdieren, de muizen, hebben er groot belang bij gevrijwaard te blijven van het ongerief door de experimenten. Mensen die een heilzame werking zien in het nuttigen van visolie ter preventie van ziekte maar een duurzamer of vegetarisch alternatief willen, hebben ook een groot belang bij dit onderzoek. De maatschappij heeft eveneens een belang bij een alternatief voor visolie aangezien de visstand steeds lager wordt, en het produceren van visolie daar deels een negatieve bijdrage aan levert. De betrokken onderzoekers van de verschillende instituten hebben ook een groot belang bij de effecten van oliën in relatie tot PD. Het publiceren van de onderzoeksresultaten over de werking van visolie of variant op de preventie en behandeling van de ziekte van Parkinson is essentieel voor het wetenschappelijk onderzoek. Tot slot hebben de leveranciers van de alternatieve oliën die zij beschikbaar stellen voor dit onderzoek een commercieel belang bij positieve onderzoeksresultaten, omdat mogelijk een gezondheidsclaim toegekend zou kunnen worden aan hun product.

6. De aanvrager geeft aan nadelige effecten op het milieu te verwachten maar behandelt de rotenonresiduen uit de kooien zorgvuldig om milieuvervuiling te voorkomen. De DEC ziet dan ook geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep (met o.a. het orale rotenonmodel) en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en brede uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De opzet is goed uitgelegd, evenals de vier stappen; deels *in vitro* en deels *in vivo* met heldere beslismomenten. De evaluatiecriteria bij de beslismomenten zijn echter niet helder.

De DEC is bekend met het rotenonmodel en beaamt dat het rotenonmodel vaker als model gebruikt wordt om bij proefdieren (muizen) PD-achtige verschijnselen te provoceren. De DEC realiseert zich dat dit rotenonmodel ook duidelijke beperkingen kent, omdat het hier gaat om een acuut model (met voornamelijk reversibele schade door oxidatieve stress), terwijl de ontwikkeling en progressie van PD bij humane patiënten een zeer langdurig proces is en de pathofysiologie hiervan nog niet geheel duidelijk is. Aangezien het rotenonmodel een standaard, veelgebruikt en wetenschappelijk geaccepteerd model is, heeft de DEC dit als uitgangspunt genomen.

De DEC is zich bewust dat er weinig overtuigend wetenschappelijk bewijs is voor de preventieve of therapeutische werking van omega-3 bij de ziekte van Parkinson. Ook het bewijs voor een antioxidante werking van omega-3 vetzuren is zwak. Er is echter wel wetenschappelijk bewijs dat visolie belangrijk is voor het cardiovasculaire systeem en de cognitieve functie van het brein. De DEC ziet ook de invloed van de gezondheidsclaims ten aanzien van visolie, zoals te koop bij drogisterijen, en de positieve waarde die sommige mensen hier aan geven (beleving, maatschappelijke vraag). Voor deze groep mensen is nu geen duurzaam en plantaardig alternatief beschikbaar. De onderzoekers willen algenolie, een veganistisch en duurzaam alternatief equivalent aan visolie onderzoeken, evenals krillolie, wat tevens duurzamer is dan visolie, maar geen geschikt alternatief voor veganisten. Tevens is visolie niet geschikt voor (de groeiende groep) vegetariërs en veganisten en willen mensen steeds meer duurzame producten. Daarbij dient wel opgemerkt te worden dat veganisten over het algemeen ook geen producten willen waar dierproeven voor nodig waren en het zeker niet op prijs stellen als er voor hen nieuwe producten ontwikkeld worden waar nu dierproeven voor nodig zijn.

De DEC heeft tevens gediscussieerd over de voorselectie van de oliën die *in vitro* getest worden. De selectiecriteria zoals chemische karakterisering en *in vitro* absorptie zijn de DEC voldoende duidelijk. Ook heeft de onderzoeker de samenstelling van de natuurlijke producten visolie, algen en krill voldoende toegelicht.

De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren, *uitgezonderd* de orale toediening van rotenon:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

Een deel van de muizen (maximaal 50%) krijgt orale maagsondes voor de toediening van rotenon. Pijnstilling wordt echter niet toegediend omdat dit de uitkomsten van het experiment kan beïnvloeden (ontstekingsmarkers). De DEC ziet de noodzaak van deze keuze in.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is met 'matig' realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het matige ongerief wordt veroorzaakt bij de dieren die door orale maagsondes rotenon toegediend krijgen, en de daaruit voortkomende PD-achtige symptomen zoals krachtverlies in de ledematen. De dosis rotenon is echter zo laag mogelijk en gebaseerd op de ruime ervaring van de onderzoekers. De met dragervloeistof behandelde muizen krijgen geen PD-achtige symptomen. De oliën worden via orale toediening gegeven, waarbij het DHA-gehalte identiek is tussen de groepen. Er wordt voor gezorgd dat tegemoetgekomen wordt aan de voedingsbehoefte van de dieren, waarbij voedsel eventueel rechtstreeks aan de kooi wordt toegevoegd. Licht ongerief komt door de gedragstesten. Tot slot worden alle dieren onder anesthesie gedood voor verder onderzoek van de weefsels, waaronder de hersenen.
12. De integriteit van een deel van dieren wordt met name fysiek aangetast door toediening van rotenon waardoor motorische problematiek zal ontstaan, vergelijkbaar met Parkinson-symptomen bij de mens, en voor alle dieren de vroegtijdige dood.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren (<2%) dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De dieren worden dagelijks gemonitord op gezondheid en welzijn. Een HEP is wanneer de muizen meer dan 15% gewicht verliezen binnen twee dagen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn om de relevantie van de vetzuren op neuro-inflammatie en neurodegeneratie te beoordelen. De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de mogelijkheid om dit onderzoek in een humane studie uit te voeren. Algenolie wordt tenslotte al gebruikt en is veilig. Het therapeutische effect zou daarom op gezonde mensen, mensen die al veel algenolie gebruiken of (al dan niet veganistische) Parkinsonpatiënten getest kunnen worden. Om de lange-termijn-effecten te zien zou dit wel een langdurig traject worden. Volgens de DEC kan het onderzoek niet klinisch uitgevoerd worden omdat de te meten parameters, die een indicatorfunctie hebben (biomarkers voor de ziekte), die tevens wetenschappelijk verantwoord zijn, niet bij mensen gemeten kunnen worden (o.a. hersenbiopten). Bij humane studies zou de bias zo groot zijn, door onder meer grote verschillen tussen mensen in voedingspatronen en leefstijl, dat het lastig is om een statistisch relevant resultaat te bereiken.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Zo worden meerdere onderzoeken in een dier uitgevoerd waardoor dieren optimaal gebruikt worden en eventuele inzet van nieuwe dieren beperkt wordt. De DEC vindt (ook na de beantwoording van de vragen) een betere onderbouwing van de 50 extra dieren wenselijk. Deze dieren zijn er niet voor de training van biotechnici, maar voor wanneer uit de powerberekening (in voorbereiding op de uitvoering van de experimenten) andere groepsgroottes komen dan in de vergunning vermeld, en voor eventuele pilots. Met de pilots willen de onderzoekers nagaan of men *dieren* kan trainen om de maagsonde beter te accepteren. Er zijn echter reeds voldoende data om een betrouwbare powerberekening te maken en dus een preciezere inschatting te maken van het benodigde aantal dieren.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood om postmortem hersenen en andere organen te kunnen analyseren voor verder onderzoek. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk nagaan of met omega-3-producten afkomstig van vis-, algen- of krillolie heilzame effecten te verwachten zijn tegen de ziekte van Parkinson, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt.
2. Er vindt een aantasting van welzijn en integriteit van de maximaal 500 proefdieren plaats, met maximaal matig ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project ertoe bijdragen dat er een duurzame equivalent van visolie onderzocht is in relatie tot de ziekte van Parkinson, en beschikbaar komt. Er is namelijk nog onvoldoende bewijs voor de werking van visolie of een alternatieve olie op de ziekte van Parkinson, maar in de maatschappij wordt hier een heilzame werking aan toegeschreven. Er zijn aanwijzingen dat omega-3 effect heeft op de gezondheid. Als dit onderzoek uitsluitsel kan geven over de werking, dan is dit waardevol voor de wetenschap. Dit gedegen onderzoek kan hier volgens de DEC aan bijdragen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden, mede gezien de betrokkenheid van leveranciers van alternatieve oliën. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat onderzoek naar de effecten van algen- en krillolie in vergelijking met visolie op het brein in een Parkinsonmodel, een reëel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met

minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Enkele leden hebben een negatief advies uitgebracht, zie tevens C3.

Een van de redenen is dat er onvoldoende wetenschappelijk bewijs te vinden is dat visolie een preventieve of therapeutische werking heeft op de ziekte van Parkinson. Omdat de werking niet bewezen is, hoeven er ook geen alternatieven voor visolie onderzocht te worden met proefdieren.

Een andere punt van kritiek van de leden die dit voorstel liever zouden afwijzen is dat er meer moeite zou kunnen worden gestoken in het vinden in een alternatieve onderzoeksmethode met menselijke vrijwilligers, al heeft een klinische studie op het eerste gezicht wetenschappelijke beperkingen.

Een punt van aandacht is dat er aanwijzingen zijn dat omega-3 vetzuren als antioxidant werken. Met het gekozen model in dit project zal men dan überhaupt 'iets' vinden, aangezien het gekozen PD-model gebaseerd is op geïnduceerde oxidatieve schade; alle drie de oliën zullen dan iets doen. Dit is bezwaarlijk als het resultaat gekoppeld wordt aan het label Parkinson, aangezien de precieze oorzaak van Parkinson niet goed bekend is en bovendien bij veel mensen een lange aanloop heeft.

Een vierde punt is de beperkte onderbouwing van het aantal dieren.

Tot slot zou de bio-equivalentie van de verschillende oliën niet aantoonbaar zijn, omdat alleen gecorrigeerd wordt voor DHA-gehalte, maar niet gekeken wordt naar andere moleculen die in de oliën zitten.

3. Onderstaande dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Dilemma:

In de kamer waarin deze aanvraag is besproken moest worden gestemd over het advies omdat er geen consensus kon worden bereikt. Er waren 6 leden om de aanvraag te beoordelen en allen hebben gestemd, waarbij geen meerderheid is behaald: er waren 3 leden voor en 3 leden tegen. Daarom is besloten de voorzitter van de andere kamer te vragen of die de aanvraag ook wilde beoordelen. Dat is gebeurd zonder dat deze op de hoogte was van de discussie, om een bias te vermijden. Die heeft met een positief advies gereageerd en het afwegingsmodel meegestuurd.

Buiten de context:

Een van de argumenten in het onderzoek is om overbevissing tegen te gaan. Er zijn echter andere middelen om overbevissing tegen te gaan, zoals geen vis eten of stoppen met het voeren van vismeel aan dieren in de veehouderij en de intensieve visteelt. De invloed van het gebruik van visolie op overbevissing is vrij klein. Het overschakelen op een alternatief zal het probleem van overbevissing waarschijnlijk minimaal beïnvloeden.

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#); [CvB postmap \(UBD BS\)](#)
Cc: dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD10800202518822
Date: donderdag 22 mei 2025 15:52:30

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

[REDACTED]

Op 28-03-2025 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD10800202518822. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

Onduidelijkheden

In de bijlage dierproeven onder 'A. Experimental approach and primary outcome parameters' subvraag drie geeft u aan dat het maximaal aantal dieren 500 zal bedragen. Kunt u het aantal dieren in lijn brengen de aantallen genoemd in de tabel onder 'B. The animals' en de NTS?

Daarnaast noemt u dat u 50 dieren voor training zult inzetten. In communicatie met de DEC geeft u aan dat de dieren niet voor training bedoeld zijn. Kunt u dit corrigeren?

Uit onze administratie blijkt dat de leges nog niet zijn overgemaakt. Kunt u nagaan of de factuur reeds is betaald?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen


Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven


www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



Universiteitsweg 99, 3584 CG, Utrecht

P.O. Box 80.195, 3508 TD Utrecht

Faculty of Science
Dept. of Pharmaceutical Sciences

Division of Pharmacology

Our reference

Fax

[REDACTED]

Phone

[REDACTED]

Email

[REDACTED]

Web address

www.pharm.uu.nl

Page

Page 1

Date

July 9, 2025

Subject

Reply to comment CCD

Geachte CCD,

Wij danken jullie voor de kans om ons project "The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD10800202518822 nogmaals toe te lichten. In deze brief reageren we op puntsgewijs op jullie vragen in [groen](#). Aanpassing in de bijlage en NTS zijn ook te vinden in [groen](#).

Ontbreken van onderbouwde strategie

U geeft aan dat *in vitro* modellen beperkt voorspellend zijn voor het bestuderen van de bloed-breinbarrière. In uw experimentele set-up zult u de dieren onderwerpen aan verschillende strategieën waarin u de werking van verschillende oliën zult onderzoeken in een rotenonmodel. Kunt u aangeven of u het passeren van de bestanddelen van de oliën door de bloed-breinbarrière zult onderzoeken voordat u dit zult bestuderen in een rotenonmodel? Zo ja, kunt u de strategie hiervan beschrijven in de bijlage dierproeven. Zo nee, kunt u deze keuze onderbouwen?

Ja, het passeren van bestanddelen van de oliën door de bloed-breinbarrière (BBB) wordt voorafgaand aan het rotenonmodel onderzocht binnen een gefaseerde *in vitro*-strategie.

Het passeren van de oliën door de BBB is onderdeel van de huidige *in vitro* strategie. Om dit te adresseren hebben wij een *in vitro* BBB systeem opgezet. Fysiologisch gezien komen de oliën, zo als ze commercieel verkrijgbaar zijn, niet in die vorm in het lichaam voor. Normaal gesproken worden deze oliën door het lichaam (lees darm epitheel) omgezet in bio beschikbare structuren die basolateraal worden uitgescheiden voor opname en transport door de circulatie. Om onze *in vitro* modellen zo relevant mogelijk te laten zijn, zijn de verschillende fysiologische aspecten van olie opname geïncorporeerd in onze *in vitro* modellen. Zo passeren de commerciële oliën eerst een simulatie van digestie (INFOGEST protocol) voordat ze worden toegediend aan het *in vitro* darm systeem (Caco-2 cellen) waarna we de basolaterale bio beschikbare structuren zullen analyseren voor de hoeveelheid vetten waar wij het meest geïnteresseerd in zijn (omega-3).

Deze benadering stel ons in staat een voorspelling te doen over de biobeschikbaarheid van de commerciële oliën. Hoe translationeel relevant ons *in vitro* model is zullen we verder onderzoeken middels een humane klinische studie die onderdeel is van dit project.

De BBB heeft een andere werking dan het darm epitheel en hoe de bio beschikbare structuren door de BBB worden getransporteerd is ook onderdeel van onze *in-vitro* strategie. Wij hebben een *in vitro* BBB gemaakt door brein epitheel cellen en astrocyten in co cultuur te kweken op een Transwell membraan. Hierop zullen wij de basolaterale fractie van het darm-model, die deze structuren bevat, apicaal aan het BBB systeem worden toegediend, met een stap ertussen die de lever functie nabootst. Door analyse van de basolaterale content voor aanwezigheid van omega-3 vetten kunnen we meten hoe efficiënt transport is geweest. De literatuur beschrijft een belangrijke rol voor de transporter Mfsd2a in dit proces. We zullen de betrokkenheid van dit eiwit in dit proces verder bestuderen in dit model.

Om te begrijpen of onze *in-vitro* strategie relevant is voor de opname van omega-3 vetten uit oliën in het brein is het nodig om een diermodel te gebruiken.

Hiervoor hebben wij het Rotenon model gekozen. Dit model heeft zich al bewezen gevoelig te zijn voor supplementatie met omega-3 vetten uit vis olie. In onze studie hopen wij te laten zien dat andere vegan bronnen van omega-3 ook een positief effect hebben op PD.

We hebben het gebruik van de BBB toegevoegd aan de bijlage (zie tekst box in groen):

Study Design and Methodology

This study will employ a well-established rotenone-induced mouse model of PD to assess the efficacy of omega-3-rich oils. A preselection of promising vegan omega-3 oils will be made by an *in vitro* study of the chemical form, bio-accessibility, bio-availability in blood and brain, and immune function of the oils

U geeft aan in communicatie met de DEC dat u een transportereiwit (Mfsd2a) zult onderzoeken in relatie tot het passeren van de bloed-hersenbarrière. Kunt u toelichten of het mogelijk is om de werking van dit transportereiwit in een *in vitro* model te onderzoeken voorafgaand aan dierproeven, en zo ja, waarom u daarvoor wel of niet kiest?

Wij onderzoeken het transportereiwit Mfsd2a in relatie tot DHA-opname over de bloed-hersenbarrière, en starten dit onderzoek in een *in vitro* BBB-Transwell model met hCMEC/D3-cellen en astrocyten. In dit model onderzoeken we de expressie van Mfsd2a en de doorlaatbaarheid van verschillende vormen van DHA, al dan niet met blokkade van Mfsd2a.

Dit *in vitro* model geeft waardevolle informatie over het mechanisme van Mfsd2a, maar het bootst de complexe vertering, opname en systemische distributie van DHA na orale toediening niet na. Omdat deze processen essentieel zijn voor het begrijpen van de *in vivo* beschikbaarheid van DHA voor Mfsd2a, zijn *in vivo* proeven noodzakelijk als aanvulling op het *in vitro* werk.

In het *in vivo* model zullen we uitsluitend post-mortem analyses uitvoeren om de expressie van Mfsd2a in de hersenen te bepalen, met als doel de *in vivo* relevantie van ons *in vitro* model beter te kunnen beoordelen.

In uw bijlage dierproeven geeft u aan de omega 3 oliën toe te dienen via het voer van de dieren. Uit uw aanvraag is niet duidelijk in welke mate de dieren toegang zullen hebben tot het voer. Kunt u aangeven of de dieren onbeperkt toegang tot het aangepaste voer zullen krijgen? Zo ja, kunt u aangeven of een verschil in opname van omega 3 wordt verwacht en hoe dit zal worden gecorrigeerd?

De dieren krijgen het voer ad libitum. We zullen voor inname corrigeren door het meten van de opgenomen omega-3 (DHA en EPA), door inbouw te meten in relevante cellen en weefsels. Daarnaast worden de dieren gewogen op het zelfde moment als wanneer ze de oral gavages krijgen om de hoeveelheid handeling minimaal te houden. Als een dier minder eet, zien we dat in het gewicht en kunnen wij hier rekening mee houden. Ook wegen wij het voer en weten wij hierdoor hoeveel gewicht er per kooi gegeten is.

Kunt u daarnaast ook aangeven of u bijeffecten van andere bestanddelen van de verschillende oliën verwacht in de door u gekozen set-up?

De oliën die wij willen gaan gebruiken zijn afkomstig van bedrijven zoals Fermentalg en Bioriginal. Deze bedrijven produceren ook oliën die bedoeld zijn voor humane consumptie en voldoen aan internationale voedselveiligheidsnormen zoals ISO 22000 en/of FSSC 22000. Dit betekent dat hun productieprocessen zijn ingericht op voedselveiligheid en traceerbaarheid, en dat de oliën geschikt zijn voor consumptie volgens de geldende normen. Er worden dan ook geen nadelige gezondheidseffecten verwacht.

De oliën zullen voornamelijk bestaan uit vetzuren, met DHA als belangrijkste component. Om oxidatie van DHA te voorkomen, worden er antioxidanten toegevoegd, zoals tocoferolen en/of carotenoiden. Deze antioxidanten dragen bij aan de stabiliteit van de olie en zijn zelf ook bekende nutriënten, die in deze hoeveelheden geen nadelige effecten op de gezondheid zullen hebben.

Overige punten

In uw bijlage dierproeven geeft u aan 50 dieren extra aan te vragen voor eventuele statistische herberekeningen. Kunt u de powerberekening herzien, waarbij u rekening houdt met het minimum aantal dieren om een verschil aan te kunnen tonen, en een maximum aantal dieren aan te vragen in uw bijlage dierproeven?

Samen met de IvD hebben wij een statisticus benaderd (Peter van de Ven) die ons heeft geholpen met een power calculatie. Wij hebben minimaal 100 dieren en maximaal 300 dieren nodig. De power calculatie en het aantal dieren hebben wij aangepast in de bijlage en NTS (zie tekst box voor aanpassing bijlage).

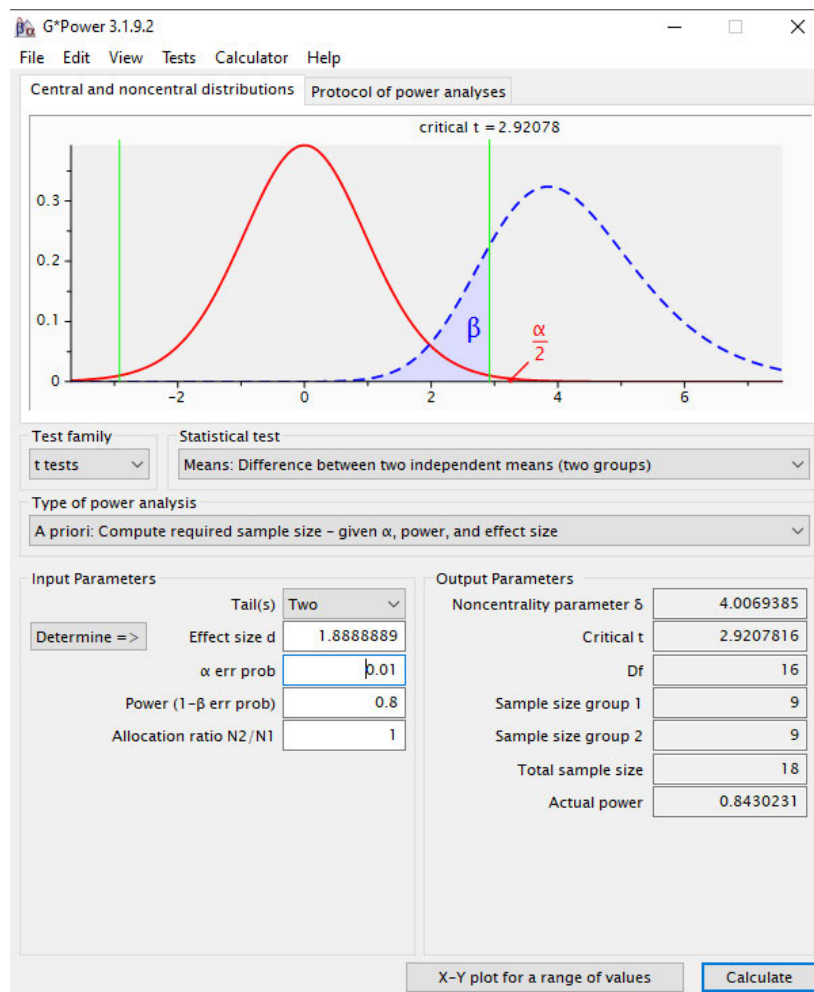
In ons lab hebben wij het orale rotenone model vaker gebruikt en zien wij dat de spatial memory test de hoogste variatie veroorzaakt. Daarom is de powercalculatie hierop gebaseerd. Wij komen met de powercalculatie op 10 dieren per groep. Wij willen 5 oliën testen per studie in een vehicle (geen PD controle) (50) en een Parkinsons (50) model, dus 100 dieren per studie. Voor de late-onset en treatment studie willen wij alleen de veel belovende oliën testen uit de voorgaande studie (preventie voor late-onset; late-onset voor treatment).

- Prevention: 100 muizen
- Late-onset: 100 muizen

- Treatment: 100 muizen
- Totaal: 300 muizen

Wij gaan per set-up te werk en zullen beginnen met de prevention set-up. Het minimum aantal dieren is dus 100. Wanneer deze set-up niet werkt (geen positief effect laat zien op PD symptomen met algen olie) zullen wij niet verder gaan naar de late-onset en treatment set-ups.

Previous studies have shown that the interaction time with the displaced object is the primary outcome that shows the highest variability (cognitive function spatial memory). Therefore, in this experiment, we could determine the desired effect (35 seconds) Spread in the outcome parameter $SD=18$ seconds. The effect size was calculated using the data from the differences between groups and the standard deviations (power = 0.8 and alpha = 0.01). In Gpower we obtain the total sample size of 9.2 animals per group, so this will be 10 animals per group.



10 x 10 groups x 3 set-ups = maximum 300 animals (minimum 100 animals).

In uw bijlage dierproeven noemt u dat bij de dieren Evans blue wordt toegediend via orale gavage om de intestinal transit time vast te stellen. Kunt u aangeven met welke frequentie deze orale gavage zal plaatsvinden?

Deze oral gavage zal één keer plaats vinden. Wij meten de Evans blue intestinal transit time 1 keer.

Kunt u daarnaast, met oog op de stapeling aan handelingen (dagelijkse gavages, model inductie, ziekteverschijnselen en verschillende testen), aangeven hoe u zult voorkomen dat de dieren ernstig ongerief kunnen ervaren?

De muizen krijgen 5x per week één oral gavage met rotenon voor 6 weken en 1x in totaal een oral gavage met evans blue aan het einde van het experiment. Om ervoor te zorgen dat de muizen zo min mogelijk ongemak ervaren tijdens het onderzoek, nemen we verschillende maatregelen. De muizen zullen alleen behandeld worden door getrainde dierverzorgers/onderzoekers. Dit om de handelingen die ze kunnen ervaren als onprettig zo goed mogelijk uit te voeren. Daarnaast worden de muizen gehuisvest in groepen, zodat ze sociaal contact hebben met andere dieren. Hun omgeving wordt verrijkt met speeltjes en materialen om ze actief en bezig te houden, wat helpt om stress te verminderen en hun welzijn te verbeteren.

Verfijning van gavageprocedures:

Een belangrijke stap is om de muizen te laten wennen aan de handelingen die we uitvoeren. Omdat we de muizen 5 keer per week voor 6 weken oral gavages krijgen via een zacht buisje, trainen we ze om hiermee vertrouwd te maken. Alle orale gavages worden uitgevoerd door getraind en ervaren personeel met behulp van atraumatische, flexibele gavage-buisjes om ongemak en het risico op verwondingen te minimaliseren. De dieren worden voorafgaand aan het onderzoek gewend aan zachte hantering en gavage om stress te verminderen.

Monitoring en humane eindpunten:

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op tekenen van stress, gewichtsverlies of klinische symptomen. Er wordt een gestandaardiseerd scoresysteem gebruikt om het welzijn te beoordelen. We hebben het model al meerdere keren toegepast en het humane eindpunt werd in minder dan 2% van de gevallen bereikt.

Beperking van stress door gedragstesten:

Gedragstesten worden zorgvuldig geselecteerd om overlapping en overbelasting te voorkomen. Dieren krijgen voldoende hersteltijd tussen de testen en de tests worden uitgevoerd in een rustige en gecontroleerde omgeving.

Verder stelt u in uw bijlage dierproeven enkele algemene humane eindpunten. Kunt u aangeven of u ook humane eindpunten zult toepassen als gevolg van complicaties van de rotenon behandeling en/of de stapeling van orale gavages?

Wij hadden eerder al de volgende generieke humane eindpunten vastgesteld:

General clinical signs (fur condition, posture, behavior, etc.) are observed daily. If animals show signs of discomfort they will be weighted daily. When body weight loss is more than 15% within 2 days animals will be euthanized.

In our experience the likely incidence of reaching human endpoint is <2%. (AVD108002016643)

Na overleg met de IvD, hebben wij de volgende klinische humane eindpunten toegevoegd die specifiek zijn voor de oral gavages (die 5x per week zullen plaatsvinden) en als gevolg van de rotenon behandeling:

Next to the general signs, these are the specific clinical signs we will look for in our mice:

Specific clinical signs:

Human end points for esophageal damage specific for mice undergoing repeated oral gavage:

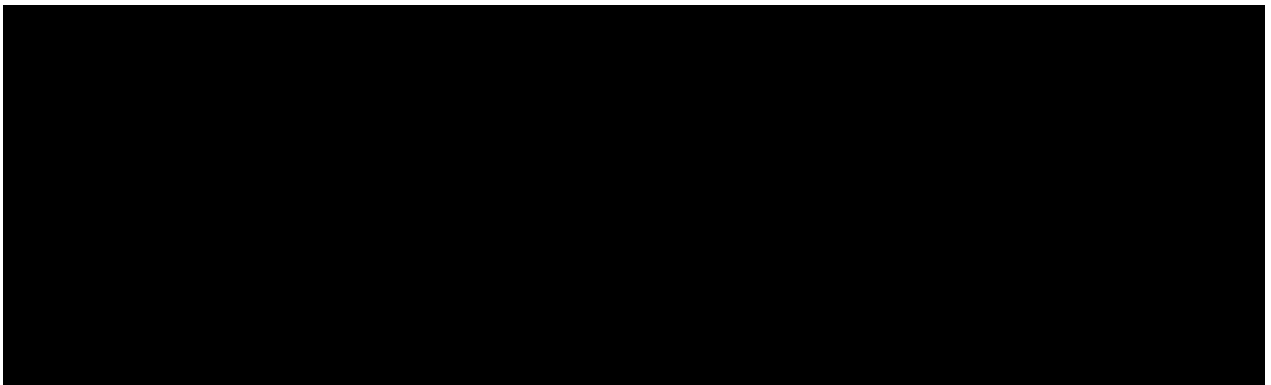
- Persistent or severe respiratory distress (gasping, noisy breathing, or labored breathing that does not resolve within 15 minutes).
- Esophageal rupture or leakage, diagnosed by swelling of the neck or under the forelimbs.
- Inability to eat or drink. Diagnosed using the body condition score and HEP at a score of 1 [1].

Humane end points for rotenone treatment and as a consequence of the PD:

- Inability to eat or drink. Diagnosed using the body condition score and HEP at a score of 1 [1].
- Severe motor dysfunction: Diagnosed using the rotarod, and HEP if they cannot stand by themselves on the rotarod. (The rotarod will be used during the experiment; no extra rotarod will be done.)
- Paralysis: inability to move certain limbs (not seen before in our model)

[1] M. H. Ullman-Culleré and C. J. Foltz, "Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice," 1999.

Yours sincerely,





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

Heidelberglaan 8
3584CS UTRECHT

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10800202518822

Bijlagen
3

Datum : 13 augustus 2025

Betreft : Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 28 maart 2025 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD10800202518822. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om de in de vergunning genoemde dierproeven uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 november 2025 tot en met 31 oktober 2030.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 mei 2025.

Wij hebben de DEC om aanvullend advies gevraagd over uw reactie op het voorgenomen besluit. De DEC heeft hier op 22 juli 2025 een aanvullend advies over uitgebracht. De DEC heeft aangegeven dat het advies aan de CCD van 14 mei 2025 niet is gewijzigd.

Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 11 juni 2025 en 9 juli 2025 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven.

De aanvullingen hadden betrekking op het format van de ingediende NTS en het benoemen van het maximale aantal dieren in de bijlage dierproeven. In een tweede vragenronde bent u gevraagd in te gaan op een voorgenomen besluit. Uw

reactie had betrekking op de nadere onderbouwing van de strategie, de (stapeling aan) handelingen bij de dieren, het aantal in te zetten dieren en toe te passen humane eindpunten.

Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Centrale Commissie
Dierproeven

Datum
13 augustus 2025

Onze referentie
AVD10800202518822

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

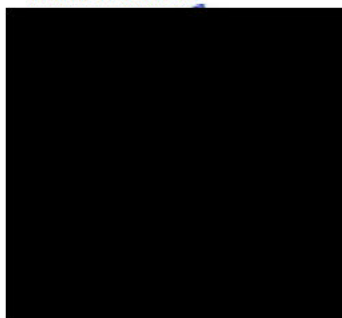
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Straat en huisnummer: Heidelberglaan 8
Postcode en plaats: 3584CS UTRECHT
Deelnemersnummer NVWA: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 november 2025 tot en met 31 oktober 2030, voor het project "The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD10800202518822, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistant Professor.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 maart 2025

2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:

a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 mei 2025;

b Bijlagen dierproeven

• 3.4.3.1 The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease, zoals ontvangen op 9 juli 2025;

c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 9 juli 2025;

d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 mei 2025.

e Aanvullend advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 22 juli 2025.

f De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 11 juni 2025 en 9 juli 2025

Naam proef	Diersoort / Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
3.4.3.1 The effect of omega-3 from different sources on preventing, delaying, and treating Parkinson's Disease				
	Muizen (Mus musculus)	300	100,0% Matig	

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Aanvraagnummer:
AVD10800202518822

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Aanvraagnummer:
AVD10800202518822

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.