

| | | |
|---|-------------------------------------|----------|
| | Dossier: AVD10800202317438 | |
| | | Aanwezig |
| 1 | NTS | X |
| 2 | Aanvraagformulier | X |
| 3 | Projectvoorstel | X |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven | 2X |
| 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 | Behandeling van beschadigd kraakbeen en bot bij paarden |
| NTS-identificatiecode | NTS-NL-072271 v.1, 07-02-2024 |
| Land | Nederland |
| Taal | nl |
| Duur van het project, uitgedrukt in maanden. | 60 |
| Trefwoorden | kraakbeen bot behandeling operatief paarden |
| Doel(en) van het project | Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Spier- en botaandoeningen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren |

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>Het doel van dit project is om de behandeling van beschadigingen aan gewrichtskraakbeen en onderliggend bot te verbeteren. Beschadigd kraakbeen heeft bij volwassen mensen vrijwel geen vermogen tot volledig zelfherstel. Het littekenweefsel dat normaal gevormd wordt bij de beschadiging van gewrichtskraakbeen is van een slechte kwaliteit en is niet bestand tegen zware belasting. Dit leidt tot verdere schade, ook aan het omliggende, in eerste instantie nog intacte weefsel. Uiteindelijk leidt dit tot een gewricht dat niet meer werkt en zeer pijnlijk is. Daarom is schade aan kraakbeen en bot een groot probleem dat kan leiden tot ernstige gewrichtsziekten en permanente invaliditeit.</p> <p>Gewrichtsproblemen komen ook bij paarden veelvuldig voor en resulteren vaak in vroegtijdig doden van het dier omdat de dieren niet meer kunnen werken. Op dit moment is de enige behandeling voor ernstige gewrichtsschade vervanging met een kunstgewricht. Kunstgewrichten zijn echter niet beschikbaar voor paarden en bij mensen slijten deze kunstgewrichten op lange termijn (maximale levensduur 20 jaar). Dit onderzoek richt zich daarom op het testen van gespecialiseerde materialen die zijn ontwikkeld om kraakbeen en/of botbeschadigingen blijvend te herstellen, waardoor op lange termijn bewegen zonder pijn mogelijk wordt.</p> <p>Er zijn sterke overeenkomsten tussen de gewrichtsstructuren en ziekteprocessen van mensen en paarden. Daarom heeft onderzoek naar de oorzaken en behandelingen van beschadigingen aan gewrichtskraakbeen en bot bij paarden veel potentieel voor het boeken van vooruitgang in zowel de menselijke als de diergeneeskunde. De resultaten van dit onderzoek zullen waardevolle inzichten geven in dit vakgebied, en draagt bij aan de ontwikkeling van betere therapieën voor gewrichtsziekte in zowel mens als dier.</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 | <p>Bij onderzoek naar gewrichten is het paard een geschikte diersoort vanwege de sterke overeenkomst tussen gewrichten van paarden en mensen. Verder zal de behandeling ook bijdragen aan een verbetering van de behandelingen voor paarden als soort. Paarden hebben namelijk heel veel last van gewrichtsproblemen en zijn dus zeker niet alleen proefdier, maar ook doeldier. Op dit moment zijn er geen behandelingen die het gewricht blijvend herstellen of waardoor op lange termijn bewegen zonder pijn mogelijk wordt.</p> <p>We doen onderzoek om nieuwe behandelingen te ontdekken voor het herstellen van gewrichtsschade aan zowel kraakbeen als bot, met behulp van geavanceerde technieken zoals het 3D-printen van weefsel of het herprogrammeren van de cellen in het gewricht. In beide gevallen wordt gekeken of de beschadigingen die we aanbrengen herstellen als gevolg van onze behandeling. Het belangrijkste doel van dit onderzoek is om te bepalen hoe duurzaam het nieuwe weefsel is en hoe stabiel het is onder belasting. Om dit doel te bereiken, evalueren we de kwaliteit</p> |

worden bereikt nadat het project is afgerond).

van het kunstmatige kraakbeen en bot, evenals de algehele gezondheid van het gewricht.

Op korte termijn hopen we behandelingen te ontwikkelen die beter werken dan de bestaande behandeling voor gewrichtsziektes. Verder zullen we onze kennis vergroten over hoe gewrichtsziektes zich ontwikkelen wat mogelijk tot nieuwe inzichten kan leiden. Op de lange termijn is het doel om een blijvende oplossing te vinden voor deze beschadigingen aan het gewricht.

VOORSPELDE SCHADE

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

Nieuwe behandelingen/ kunstmatig gewrichtsweefsel zal al van tevoren in het laboratorium getest zijn op cellen en weefsel. Bovendien kunnen haalbaarheidsstudies (bijvoorbeeld om te testen of een materiaal geïmplant kan worden en op zijn plaats blijft) in kadavermateriaal worden uitgevoerd met behulp van gewrichten van paarden die ter beschikking van de wetenschap zijn gesteld. Vaak zijn de materialen al eerst getest op hun eigenschappen (roepen ze een afweerreactie op of niet?) en veiligheid (zijn ze niet giftig?) in experimenten met kleinere dieren.

In gevallen waarin de veiligheid bij paarden niet is vastgesteld, worden veiligheidstests uitgevoerd met paardencellen (geïsoleerd uit bloed). Een kleine hoeveelheid bloed (10-50 ml) is nodig voor de veiligheidstests uitgevoerd met paardencellen. Dat bloed wordt getapt bij paarden die in eigendom van de kliniek zijn en die normaal gebruikt worden voor onderwijs. De paarden worden zorgvuldig geselecteerd door het kliniekpersoneel om ervoor te zorgen dat ze niet te vaak voor onderwijs of onderzoek worden gebruikt. Bloedtappen bij paarden is overigens een handeling die weinig ongerief veroorzaakt en waar de meeste dieren niet of amper op reageren. Het bloed wordt in het laboratorium blootgesteld aan de behandelingen/ kunstmatige weefsel en de reactie van de bloedcellen gemeten. Op basis van deze metingen kan een voorspelling worden gedaan over hoe het zal reageren in een levend paard.

Subcutane (onder de huid) implantatiestudies worden uitgevoerd om een ongunstige reactie uit te sluiten in levende paarden. Voor de subcutane implantatie zullen we een kleine hoeveelheid behandelingen/kunstmatige weefsel net onder de huid in het nek- of borstgebied van een paard implanteren onder plaatselijke verdoving.

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?

Bij ons onderzoek voeren we operaties uit op gezonde paarden. De operaties zullen onder narcose worden uitgevoerd, wat altijd enige risico's met zich meebrengt omdat sommige dieren, net als de mens, slecht kunnen reageren op de narcose. In zeldzame gevallen kan een dier tijdens de operatie overlijden. Tijdens de herstelperiode kan het paard enkele uren pijn ervaren. Als het paard pijn heeft na de operatie, zullen we rust voorschrijven en pijnstillers toedienen. Er is een kleine kans dat de wond ernstig geïnfecteerd raakt, in dat geval zullen we direct actie ondernemen. Te allen tijde is bloedvergiftiging of afstervend weefsel reden om direct in te grijpen. In de 24 uur na de ingreep zal een dierenverzorger/getraind onderzoeker in de gaten houden of er sprake is van tekenen van pijn of ontsteking. Mocht op basis van gedrag twijfel bestaan over de gezondheid van het paard kan ten alle tijden overlegd worden met een dierenarts. Het maximaal aanvaardbare eindpunt wordt voor het experiment vastgelegd in overleg met de verantwoordelijk onderzoeker en wordt gecommuniceerd naar alle betrokkenen.

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

| Soort: | Totaal aantal | Geraamde aantallen naar ernstgraad | | | |
|--|---------------|------------------------------------|-------|-------|---------|
| | | Terminaal | Licht | Matig | Ernstig |
| Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae) | 130 | 0 | 40 | 90 | 0 |

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

| Soort: | Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren | | |
|--|--|----------------|-------------|
| | Hergebruikt | Teruggeplaatst | Geadopteerd |
| Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae) | 30 | 0 | 0 |

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

De dieren die gebruikt worden voor bloedafname en subcutane (onder de huid) implantatiestudies zullen altijd hergebruikt worden. Als klinische waarnemingen (denk aan zwelling, huidtemperatuur, drukgevoeligheid) voldoende zijn en als er geen ernstige effecten optreden ten gevolge van het experiment worden de paarden na een herstel periode hergebruikt. Mochten we geïnteresseerd zijn in de omliggende weefsels dan kunnen de paarden in parallel gebruikt worden voor chirurgisch

onderwijs. Na implantatie worden dan operatie technieken geoefend en zal het dier gedood worden. De paarden die gebruikt worden voor het kraakbeen-/botdefectexperiment zullen aan het einde van het experiment gedood worden zodat we een grondig onderzoek kunnen doen naar het betrokken weefsel.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

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

Het huidige onderzoek gaat over het testen van nieuwe behandelingen die al eerder zijn getest zonder dierproeven. Voordat we dierproeven uitvoeren, onderzoeken we de materialen uitgebreid in het laboratorium om hun effectiviteit te bepalen en te bepalen of ze niet schadelijk zijn voor levende cellen. Bovendien testen we de materialen vaak op weefsels van overleden dieren, die afkomstig zijn uit een slachthuis of ter beschikking gesteld van de wetenschap vanuit de kliniek. Verder werken we actief aan de ontwikkeling van onderzoeksmethoden die geen levende dieren nodig hebben, zodat we simpelere experimenten kunnen vervangen. Maar voor een grondig onderzoek naar de volledige functionaliteit van een gewricht en de daadwerkelijke reparatie van bot en kraakbeen is een levend dier nodig.

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.

In ons onderzoek voeren we voorafgaande tests uit op levende dieren, specifiek paarden, die voor meerdere studies worden gebruikt. Waar mogelijk zullen behandeling en controle worden uitgevoerd binnen hetzelfde dier (het dier heeft immers meerdere benen). Hierdoor kan de variatie tussen de dieren worden omzeild en daarmee de benodigde groepsgrootte van de dieren worden verminderd.

3. Verfijning

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

Voordat het experiment start krijgen de dieren een aantal dagen de tijd om gewend te raken aan de nieuwe omgeving. In deze periode raken ze gewend aan de stal en het worden aangeraakt door mensen. Na alle experimenten waarbij iets geïmplant wordt, wordt door een dierenverzorger/onderzoeker elke 2 uur gekeken of het dier pijn heeft. Voor en na het experiment zal er altijd een lage dosis pijnstiller worden gegeven. Wanneer er pijn wordt vastgesteld na het experiment wordt in overleg met een dierenarts extra pijnstilling gegeven. Er is ten tijde van het gehele experiment en herstelperiode van het experiment een dierenarts beschikbaar voor overleg.

We gebruiken geavanceerde technieken, onder andere door met gespecialiseerde sensoren en apparatuur in ons moderne bewegingslaboratorium de bewegingen van de dieren vast te leggen en te meten waardoor we hun herstel kunnen beoordelen. Ook gebruiken we voor het monitoren van het herstel zogenaamde biomarkers, specifieke moleculen in gewrichtsvloeistof en/of bloed die een maat vormen voor de gezondheidstoestand van de weefsels in het gewricht. Deze technieken kunnen samen met andere gebruikt worden voor de gedetailleerde karakterisering van het herstelweefsel na afloop van een experiment.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Het gebruik van gezonde paarden bij onderzoek naar aandoeningen van gewrichten bij paarden en mensen is een essentiële stap in het ontwikkelen van effectieve behandelingen voor gewricht gerelateerde ziektes. Paarden zijn een geschikte diersoort omdat hun gewrichten opmerkelijk veel overeenkomsten vertonen met menselijke gewrichten maar zeker ook omdat de diersoort zelf veel last van gewrichtsaandoeningen heeft. De overeenkomst in de structuur van gewrichten tussen paarden en mensen maakt het mogelijk om behandelingen te evalueren bij gezonde dieren, wat kan leiden tot betere behandelmogelijkheden voor gewricht gerelateerde aandoeningen bij mens en paard.

Gezond omliggend weefsel is een essentieel aspect van gewrichtsonderzoek, omdat de toestand van dit weefsel van invloed kan zijn op de effectiviteit van behandelingen. Door gezonde paarden in het onderzoek te gebruiken, kan het effect van materialen behandeling op gezond weefsel nauwlettend worden gevolgd. Deze benadering biedt een beter begrip van de manier waarop behandelingsopties gezond weefsel rond het gewricht kunnen beïnvloeden, waardoor onderzoekers geïnformeerde beslissingen kunnen nemen bij het ontwikkelen en testen van nieuwe behandelingen.

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 | |
|--|--|



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3
 Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1
 Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

- 1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

| | | | | |
|--|----------------------|-------------|------------|--|
| Naam instelling of organisatie | Universiteit Utrecht | | | |
| Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder | Titel | Voorletters | Achternaam | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw |
| E-mailadres contactpersoon | info@ivd-utrecht.nl | | | |

| | | | | |
|---|--------|-------------|------------|---|
| Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing) | Titel | Voorletters | Achternaam | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw |
| E-mailadres gemachtigde | n.v.t. | | | |

- Vul de gegevens van het postadres in.

| | | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------|---------|
| Straat en huisnummer | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht | | 50 |
| Postcode en plaats | 3584CJ | UTRECHT | |
| Postbus, postcode en plaats | 80125 | 3508TC | UTRECHT |

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

| | | |
|-----------------------------|-------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | Clinical Sciences | |
| Telefoonnummer | | |

| | | |
|-----|--|--|
| | E-mailadres | [REDACTED] |
| 1.5 | (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| | Functie | [REDACTED] |
| | Afdeling | Clinical Sciences |
| | Telefoonnummer | [REDACTED] |
| | E-mailadres | [REDACTED] |
| 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 [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| | Functie | [REDACTED] |
| | Afdeling | Clinical Sciences |
| | Telefoonnummer | [REDACTED] |
| | E-mailadres | [REDACTED] |
| 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 hier onder 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 geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn? | <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder 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 1 - 2 - 2024 Einddatum (t/m) 31 - 1 - 2029 |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | (Osteo)chondral defect repair in horses |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | Treatment of damaged cartilage and bone in horses |
| 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 | | |
| Ordernummer: CB.841910.3.01.011 | | |

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

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

| | |
|--|-------------------------------|
| Verplicht | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel | Aantal bijlage(n) dierproeven |
| <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 | [Redacted] |
| Functie | [Redacted] |
| Plaats | Utrecht |
| Datum | [Redacted] |
| Handtekening | [Redacted] |



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 (0900-2800028).

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 Provide the title of the project. | Osteochondral defect repair in the horse as target and translational species. |

2 Categories

| | |
|---|---|
| 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic research |
| | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research |
| | <input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production |
| | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal |
| | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
| | <input type="checkbox"/> Higher education or training |
| | <input type="checkbox"/> Forensic enquiries |
| | <input type="checkbox"/> 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.

Articular cartilage damage is problematic because the collagen network of its extracellular matrix, which is the structure-giving element of the tissue, is known to lack any regenerative capacity in mature individuals due to its minimal turnover (Heinemeier et al. 2016), which already in the 18th century led to the observation that "ulcerated cartilage will never repair" (Hunter 1743). The scar tissue that is formed, is of inferior quality

and dysfunctional at the longer term, leading to progressive deterioration. Replacing the lost cartilage with a material that induces adequate cartilage repair and protects the surrounding native tissue has been investigated as a therapeutic approach by experts in regenerative medicine for a while now. However, no satisfying solution has been found yet and (in humans) in the end total joint replacement remains the solution, as there are currently no effective less invasive treatment options available. The main difficulty in the regenerative medicine of articular cartilage is the virtually absent regenerative capacity of the native tissue, as mentioned above, together with the long-time focus on the biological rather than the biomechanical (*i.e.* functional aspects) of developed implants (Malda et al. 2019). The societal impact of joint disorders is great. They affect strongly Quality of Life in the human population while at the same time being a huge economic burden to the health care systems. Recently, the number of people suffering from osteoarthritis (OA), the most prevalent joint disease, was estimated at 500 million worldwide (Mahmoudian et al. 2021) and in the period 1990-2017 knee OA (the most prevalent form in humans) had risen by 9.3% (Safiri et al. 2020). The problem is quickly getting more important due to the increasingly ageing population. In the US total knee replacements in 2020 were >1 million and are predicted to have risen by 400% in 2040 (Singh et al. 2019).

In horses, joint disorders severely affect equine welfare, with a survey in the Netherlands showing that 15% of horses exhibited gait irregularities or overt lameness (Visser et al. 2014). Joint disorders are a significant cause of lameness (USDA 2000) and surveys estimate that up to 60% of lameness is related to OA (Caron and Genovese 2003). There are less epidemiological data on ponies, as these are used less in equestrian competitions. However, in a prospective study in horses and ponies used for eventing competitions (formerly called the "military"), 45% of horses and ponies had to be withdrawn from competition because of locomotor injury and this percentage was similar between the ponies and horses (Munsters et al 2013). In most of our studies ponies are used instead of horses because the joint size is even closer to that of humans and they are easier to house. Furthermore from an animal welfare perspective, ponies seem to recover faster from surgery compared to horses (McIlwraith et al 2011, Husby et al 2016). It should be kept in mind that ponies and horses belong to the same species with a rather arbitrary height at the withers of 14½ hands (1.47m) being the sole discriminant. Of course there are different breeds of both horses and ponies. However, interbreed differences are much less than in a species like the dog. Ponies or other small horses have frequently been used successfully to evaluate Osteochondral Implants by our group in the past [REDACTED]

In animals advanced joint damage can only be treated palliatively with analgesic medication, the prolonged use of which is known to lead to severe side-effects. In a species like the horse that is mainly kept for its locomotor capacity, advanced joint damage often means life-ending. The similarity between humans and horses with respect to the impact of joint disorders in general and OA specifically, the recognition of the strong resemblance of both joint biology and the prevailing pathologies and the existence of a huge and as yet unmet clinical need for effective treatment of degenerative joint disorders in both species has led to the recognition of the horse as one of the large animal models appropriate for assessing the effects of new therapies for cartilage repair or replacement by the Food and Drug Administration (USDA 2011). Other species often used in joint disease research like goats and sheep are rarely kept for their locomotor capacity and therefore the incentive to treat joint disease in these species is low compared to equines. There is also a special mention of the similarity of human and equine joints, especially the knee joint (Malda et al. 2012), and the biomechanical environment in an equine joint approaches the human situation much better than the classic smaller laboratory species (reviewed in Meng et al 2020).

With respect to the resemblance of human and equine joints, there is specific detailed information on the knee joint (Malda et al. 2012), and on the biomechanical environment in an equine joint that approaches the human situation much better than the classic smaller laboratory species (reviewed in Meng et al 2020). We prefer to use ponies rather than horses because they are logistically easier to deal with, including the possibility of group housing, which is preferred from the welfare perspective in this social species, and because of the better availability of healthy and able-bodied animals for a reasonable price. From an animal welfare perspective, ponies seem to recover faster from surgery compared to horses (McIlwraith et al 2011, Husby et al 2016). In a scientific sense, ponies come closer to humans in terms of weight and hence are preferable in a translational sense. As a model for the equine species itself, it should be kept in mind that

ponies are just variations within the same species with a rather arbitrary height at the withers of 14½ hands (1.47m) being the sole discriminant. Interbreed differences are much less than in a species like the dog and there is no reason to assume they cannot represent the species. Ponies or other small horses have frequently been used successfully to evaluate Osteochondral Implants by our group in the past ([REDACTED])

The goal of this project is to investigate novel drugs or implants/materials for their capacity to repair cartilage and/or bone in horses. The current application focuses on the surgical model for (osteo)chondral defects that represents a model for clinically occurring (osteo)chondral defects. As the degree and depth of damaged tissue may differ, there are different approaches. In the case that only the cartilage layer is damaged, defects may be treated by applying a sealing gel to restore the surface. However, in the (frequent) case that the subchondral bone is affected as well, an osteochondral scaffold will be the method of choice, which requires specialized approaches different from those aimed at cartilage repair (Dias et al. 2018) that include the development and testing of materials that enhance bone repair (osteoconductive materials) need to be developed and tested together with those aimed at cartilage repair. The surgical model has originally been developed based on previous models established by Frisbie et al. in 2008 and McIlwraith et al. in 2011. However, our research group has further refined it over the past years in which much progress has been made in osteochondral scaffold design, especially with regard to the bone anchor of the scaffold, the integration of the bone and the cartilage phase of the scaffold and the use different converging bioprint techniques, such as the combination of extrusion printing and melt electro-writing ([REDACTED])

[REDACTED] The model has now reached a high level of reproducibility and allows for more comprehensive analyses, including the use of biomarkers, imaging techniques, and gait analysis.

Experiments in this project typically involve the use of (bio)materials designed to fill the osteochondral defect, facilitate repair, and prevent deterioration of the surrounding healthy tissues. Recently, we reached a milestone with this model (AVD1080020186885), as we were able to show that adding a melt electro-woven caprolactone (a slowly degrading biomaterial) structural network to the gel in the cartilage phase that was anchored in the bone phase gave excellent results. After a 6-month period in vivo in the stifle of Shetland ponies, the biomechanical properties of the neo-tissue had not deteriorated and remained close to those of the native tissue ([REDACTED]). In this hybrid approach for osteochondral implants a (cell-friendly) hydrogel is combined with a robust and resistant structural support. This seems to be a very promising approach indeed that certainly merits follow-up studies. The results of this research will help to improve current methods and materials, expand knowledge in the field of joint regeneration, and eventually have the potential to benefit both human and equine clinics, ultimately optimizing therapeutic approaches. Thus, this model represents a crucial translational step toward improving the prognosis of joint diseases and reducing the significant socioeconomic burden associated with these disorders. These results have yet to be validated in a longer term experiment and with structural support from still more resistant or completely non-degradable filamentous materials to come to a real long-term (at least the 15-20 years lifespan of a metal implant) hybrid regenerative solution. The proposed project (AVD10800202317438) is thus a logical and natural continuation of the one ending in 2024 (AVD1080020186885) in which, as indicated, much progress has been made. Research into regenerative solutions for joint disorders is a well-known painstakingly slow and tedious process in which progress is made in small steps that cannot be expected to produce final solutions within a few years, as may be evidenced by the worldwide failure thus far to develop such a regenerative solution during the 30 years or more of research into the area.

In such a daunting endeavor, one cannot work alone. Our group works closely together with the Biofabrication research group of [REDACTED] (who holds a partial employment (30%) in our group), which group is world-leading in the development of tissue engineering techniques such as 3D bioprinting, melt electrowriting and others and specializes in the convergence of these techniques through combining them. Further, we collaborate at the technical and personal level (sharing people) with the group of [REDACTED] in our own Department of Clinical Sciences and divide the work in the best possible way from the technical, clinical and animal welfare viewpoint. [REDACTED] group focuses on intervertebral disk disease (which is very common in both people and dogs, but not in horses), the medical treatment of osteoarthritis through advanced pharmaceutical approaches such as controlled delivery of medication and on joint distraction as a treatment of joint disease. Our group focuses on the surgical intra-articular treatments of joint disease

through the (osteo)chondral defect model, as the equine joint is technically and from the translational viewpoint far more suited for that than a canine joint and because it is very relevant for the equine species. We both focus on (and collaborate in) development of biomarkers of joint disease and some medical treatments, as species differences are important here.

In this model, we utilize healthy horses and create (osteo)chondral defects, representing the initial stages of damage where the cartilage and bone surrounding the defect are still in a healthy state. One advantage of using healthy horses is that it minimizes the variability in the quality of the repair tissue and enables us to evaluate the effects on the surrounding healthy tissues. Moreover, this model closely resembles the situation observed in patients, where localized defects occur while the surrounding tissue remains healthy initially but will eventually deteriorate over time. We employ this model to assess novel treatments for repairing (osteo)chondral defects, primarily focusing on regenerative medicine approaches within our collaborative framework.

References:

- Caron JP, Genovese RL. (2003) Principles and Practices of Joint Disease Treatment. In: M. Ross, S. Dyson, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Philadelphia: W.B. Saunders 746–764. doi: 10.1016/B978-0-7216-8342-3.50092-9
- De Ruijter, M., Diloksumpan, P., Dokter, I., Brommer, H., Smit, I.H., Levato, R., van Weeren, P.R., Castilho, M., Malda, J. (2023) Orthotopic equine study confirms the pivotal importance of structural reinforcement over the pre-culture of cartilage implants. *Bioeng. & Translat. Med.*, 2023;e10614. <https://doi.org/10.1002/btm2.10614>
- Diloksumpan, P., Abinzano, F., de Ruijter, M., Mensinga, A., Plomp, S., Khan, I., Brommer, H., Smit, I., Castilho, M., van Weeren, P.R., Malda, J., Levato, R. (2021) The Complexity of Joint Regeneration: How an Advanced Implant could Fail by Its In Vivo Proven Bone Component. *J. of Trial and Error*, published March 23, 2021, <https://doi.org/10.36850/e3>.
- Dias IR, Viegas CA, Carvalho PP. (2018) Large Animal Models for Osteochondral Regeneration. *Adv Exp Med Biol*, 1059: 441-501.
- Diloksumpan, P., de Ruijter, M., Castilho, M., Vermonden, T., van Weeren, P.R., Malda, J., Levato, R. (2020a) Combining multi-scale 3D printing technologies to engineer reinforced hydrogel-ceramic interfaces. *Biofabrication*, Feb 19;12(2):025014. doi: 10.1088/1758-5090/ab69d9.
- Diloksumpan, P., Bolaños, R.V., Cokelaere, S., Pouran, B., de Grauw, J., van Rijen, M., van Weeren, R., Levato, R., Malda, J. (2020b) Orthotopic Bone Regeneration within 3D Printed Bioceramic Scaffolds with Region-Dependent Porosity Gradients in an Equine Model. *Adv. Healthc. Mater.* May;9(10):e1901807. doi: 10.1002/adhm.201901807.
- Frisbie DD, Bowman SM, Colhoun HA, DiCarlo EF, Kawcak CE, McIlwraith CW. (2008) Evaluation of autologous chondrocyte transplantation via a collagen membrane in equine articular defects: results at 12 and 18 months. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(6):667-79.
- Fugazzola, M.C., Golafshan, N., van Aken, J.A., Plomp, S.G.M., de Grauw, J.C., van Buul, W., Hermsen, G., Weinans, H.H., Dias Castillo, M., van Weeren, R., Malda, J. (2023) 3D printed and punched porous surfaces of a non-resorbable, biphasic implant for the repair of osteochondral lesions improves repair tissue adherence and ingrowth. *Pferdeheilk.* 39 (6), 505-514. DOI 10.21836/PEM20230601.
- Heinemeier, K.M., Schjerling, P., Heinemeier, J., Møller, M.B., Krosgaard, M.R., Grum-Schwensen, T., Petersen, M.M., Kjaer, M. (2016) Radiocarbon dating reveals minimal collagen turnover in both healthy and osteoarthritic human cartilage. 2016 Jul 6;8(346):346ra90. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8335.
- Hunter, W. (1743) Of the structure and diseases of articulating cartilages. *Proc. R. Soc. London* 9, 514-521.
- Husby KA, Reed SK, Wilson DA, Kuroki K, Middleton JR, Hoepf NC, Charles EM, Cook JL. Evaluation of a Permanent Synthetic Osteochondral Implant in the Equine Medial Femoral Condyle. *Vet Surg.* 2016 Apr; 45(3): 364-73. doi: 10.1111/vsu.12453. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26909761.
- Korthagen NM, Brommer H, Hermsen G, Plomp SGM, Melsom G, Coeleveld K, Mastbergen SC, Weinans H, van Buul W, van Weeren PR. A short-term evaluation of a thermoplastic polyurethane

implant for osteochondral defect repair in an equine model. *Vet J.* 2019 Sep; 251:105340. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.105340. Epub 2019 Jul 20. PMID: 31492385.

- Malda, J. Groll, J., van Weeren, P.R. (2019) Rethinking articular cartilage regeneration based on a 250-year-old statement. *Nature Rev. Rheum.*, 15:571-572. doi: 10.1038/s41584-019-0278-7.
- Malda J, Benders KE, Klein TJ, de Grauw JC, Kik MJ, Hutmacher DW, Saris DB, van Weeren PR, Dhert WJ. (2012) Comparative study of depth-dependent characteristics of equine and human osteochondral tissue from the medial and lateral femoral condyles. *Osteoarthr. Cart.* 20(10):1147-1151.
- McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. (2011) Evaluation of intraarticular mesenchymal stem cells to augment healing of micro-fractured chondral defects. *Arthroscopy*, 27(11):1552-1561.
- Meng X, Ziadlou R, Grad S, Alini M, Wen C, Lai Y, Qin L, Zhao Y, Wang X. Animal Models of Osteochondral Defect for Testing Biomaterials. *Biochem Res Int.* 2020 Jan 28; 2020:9659412. doi: 10.1155/2020/9659412. PMID: 32082625; PMCID: PMC7007938.
- Safiri S., Kolahi A.A., Smith, E., Hill, C, et al. (2020) Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study. *Ann. Rheum. Dis.* 79, 819-828. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216515
- Munsters CC, van den Broek J, Welling E, van Weeren R, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. A prospective study on a cohort of horses and ponies selected for participation in the European Eventing Championship: reasons for withdrawal and predictive value of fitness tests. *BMC Vet Res.* 2013 Sep 13; 9:182. doi: 10.1186/1746-6148-9-182. PMID: 24034152; PMCID: PMC3848563.
- Singh, J.A., Yu, S., Chen, L., Cleveland, J.D. (2019) Rates of total joint replacement in the United States: future projections to 202-2040 using the National Inpatient Sample. *J. Rheumatol.* 46, 1134-1140.
- US Department of Agriculture (2000) Lameness and laminitis in U.S. horses. USDA: APHIS: VS CEAH. Fort Collins, CO: National Animal Health Monitoring System; N318.0400.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2011) Guidance for Industry. Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage. (Available from: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.)
- Vindas Bolaños RA, Cokelaere SM, Estrada McDermott JM, Benders KE, Gbureck U, Plomp SG, Weinans H, Groll J, van Weeren PR, Malda J. (2017) The use of a cartilage decellularized matrix scaffold for the repair of osteochondral defects: the importance of long-term studies in a large animal model. *Osteoarthritis Cartilage*, 25(3):413-420
- Visser EK, Neijenhuis F, de Graaf-Roelfsema E, Wesselink HG, de Boer J, van Wijhe-Kiezebrink MC, Engel B, van Reenen CG. Risk factors associated with health disorders in sport and leisure horses in the Netherlands. *J Anim Sci.* 2014 Feb; 92(2):844-55.

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 objective of this project is to assess new drugs or implant materials for (osteo)chondral repair in horses, with a specific focus on developing materials that can repair cartilage and bone.

To evaluate the efficacy of these materials/drugs, we use an osteochondral defect model in equines, where we surgically create defects, usually in the stifle (knee) joint, and then fill or cover them with a material/drug to stimulate repair. After an incubation period that can last for weeks or months, we evaluate the quality of the repair tissue and the impact on the healthy surrounding tissues using gait analysis, imaging, biomarkers, and histology as outcome parameters. By doing this, we can determine the effectiveness of the implants and materials in terms of joint functionality, joint homeostasis, and cartilage/bone quality. Results from these

experiments will not only yield efficacy results for specific treatment options but can further our knowledge on joint homeostasis/ disease allowing us to identify new targets for future treatment options. The goal is to develop a more permanent treatment strategy for treating joint disease and ultimately cure it.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The similarity between horses and humans with respect to the articular environment has led to close collaboration between the cartilage research groups at the Faculty of Veterinary Medicine (being Prof. [REDACTED] group and ours, see also earlier in this document) and several research groups from the biomedical field. Most intense is the collaboration with the research group of the section Orthopedics of the Division of Surgical Specialisms of the University Medical Center Utrecht (UMCU), which includes PI's having dual appointments. However, there is also a strong link with Twente University, especially in the area of the repair of chondral defects. Internationally, collaborations with both biomedical groups (such as the University of Eastern Finland in Kuopio in the field of advanced intra-articular imaging) and leading veterinary research groups, such as those from the Royal Veterinary College (London, UK), Colorado State University (USA), and Massey University (New Zealand) have been established. The results of these experiments will be shared with our collaborators and in the form of publications with the entire scientific community allowing advancements in multiple biomedical disciplines.

The model has proven its feasibility and value at numerous occasions, by our group and by others. We work in the advanced facilities of the Regenerative Medicine Centre Utrecht (RMCU), which is one of the leading centers in the world in the area of bio fabrication, in close collaboration with relevant research groups of the UMCU, with cutting-edge technological approaches and involve medical and academic experts in the field to develop and design materials that have demonstrated significant potential in the lab. For example: our team is currently working on several different polymers and scaffolds that are often 3D-printed, some of which contain cells or proteins that have proven efficacy *in vitro* for the development of cartilage or bone.

The treatments for joint disease currently under development at our department are based on different targets/strategies. Some are using the so-called LPS model of an acute, transient arthritis and focus on either biomarker discovery or evaluation of pharmaceutical treatment, but that work is covered by another DEC-approval. The current application concerns the (osteo)chondral defect model. Most of the work consists in developing and refining the osteochondral scaffold discussed earlier. However, the same model has also been used for developing a non-resorbable plug and a chondral (so, cartilage only, no bone) defect has been used to test a so-called "sealing gel". The non-resorbable plug was developed together with the JointSphere company (www.jointsphere.com), on the sealing gel we work together with Hy2Care (www.hy2care.com).

Our general strategy is to use the direct government research funding to pay the salaries of the senior researchers and to find external funding for the postdocs and PhD students. We do that through grant applications by ourselves and being a partner in grant applications from other Principal Investigators in our network. Work in the past years has been financed by the European Union (FP 7 Program "Hydrozones"), by NWO (as partner in the "William Hunter project"), by the Costa Rican Ministry of Agriculture [REDACTED] by long-term funding from the Dutch Arthritis Association (formerly "Reumafonds", now ReumaNL) that was related to the recognition of our group as a "Centre of Excellence", by the Thai Government ([REDACTED] through Health Holland ("Freedom project", in collaboration with a commercial partner (the JointSphere company), and by another commercial partner (Hy2Care, a company focusing on chondral (not osteochondral) defect repair through a so-called sealing gel)). This is of course ongoing work and the strategy will be continued in the coming period.

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.

Click or tap here to enter text.

3.3 Relevance

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

Joint pain and lameness are significant issues for horses, leading to disability and wastage in this species. Similarly, musculoskeletal disorders rank as the leading cause of occupational disability in humans. Unfortunately, the therapeutic options for joint disorders are currently limited, mostly palliative, and aiming at pain severely. Damage to cartilage and bone is often the root cause of joint disorders, but articular cartilage has a severely limited, if any intrinsic capacity for functional repair. Thus, advanced regenerative medicine approaches may be the only way to achieve functional restoration of cartilage. In a species like the horse that is mainly kept for its locomotor capacity, advanced joint damage is often career-ending, which in this species often also means life-ending. Currently, the only treatment for severe joint damage is replacement with an artificial joint. However, artificial joints are currently not available for horses and in humans these artificial joints wear out (maximum lifespan of 20 years). This research therefore focuses on testing specialized drugs or materials that have been developed to permanently repair cartilage and/or bone damage, making long-term movement without pain possible.

The horse is a valuable experimental model for studying the efficacy of therapeutic approaches for repairing damage to cartilage and bone. This is because of the large similarity between human and equine joints, which is not found in any other animal model. Although dogs, goats, and sheep are also useful models, their biomechanical, anatomical, and locomotion differences with humans limit their application (McCoy et al 2015, Malda et al. 2013). Cellular structure, biochemical makeup, and biomechanical properties are most similar to human cartilage among animal species. Furthermore synovial fluid collection, arthroscopic intervention, and postoperative management is possible in horses due to their bigger size. Other species that also allow this like goats or sheep are rarely kept for their locomotor capacity and the incentive to treat horses for joint disease is therefore higher making them also a target species.

The large similarities between equine and human joint disease ensure that any relevant discoveries will also be directly applicable to the human clinic and human regenerative medicine. Thus, the horse is an experimental model for both equine and human pathologies, and equine research may yield dual benefits for both horses as veterinary patients and as a model for human disease. Numerous techniques are available to evaluate joint health, locomotion, and tissue properties in horses, and extensive knowledge is available on the biomechanical properties of equine joints. Studying the underlying mechanisms of joint disease and treatment options in the target animal is of immense importance as it can greatly improve the design of specific treatments and, thus, equine welfare. The outcomes of the evaluation of novel implants/materials for (osteo)chondral repair in horses will add valuable knowledge to the field of regenerative medicine and determine the direction of research for these materials.

References:

- Malda et al. Of mice, men and elephants: the relation between articular cartilage thickness and body mass. PLoS One. 2013;8(2):e57683.
- McCoy AM. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. Vet Pathol. 2015 Sep;52(5):803-818.

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

Science: These experiments will add to our knowledge how joint disease progresses over time and allows us to test new treatment options. In the end the goal is to develop a long term treatment strategy for joint disease. The outcomes of the evaluation of novel implants/materials for (osteo)chondral repair in horse will therefore add valuable knowledge to the field of regenerative medicine and will determine the direction of the research field for these materials.

Patients: Studying the underlying mechanisms as well as treatment options

in the target animal is of immense importance and can greatly improve the design of specific treatments and thereby improve equine welfare. In addition, the large similarities between equine and human joint disease ensure that any relevant discoveries will also be directly applicable to the human clinic and human regenerative medicine. The horse is thus an experimental model for both equine and human pathologies and equine research may hence yield dual benefits, for both horses as veterinary patients and as a model for human disease. Successful new treatments will reduce the need for palliative treatments aiming at pain relief and hence substantially improve equine welfare. Further, these treatments will reduce the amount of horses that need to be euthanized due to joint disease. For both species new treatments that yield more permanent and durable solutions for joint disease will be hugely beneficial. Negative effects could include the rising costs of treatments making them unavailable to parts of the patient population; some of the treatments currently under development are more expensive than total joint replacement.

Medical professionals: During our experiments students will have the opportunity to see surgical procedures and learn. Surgeons will benefit by gaining experience improving their skills and new insights into how to conduct orthopedic surgery.

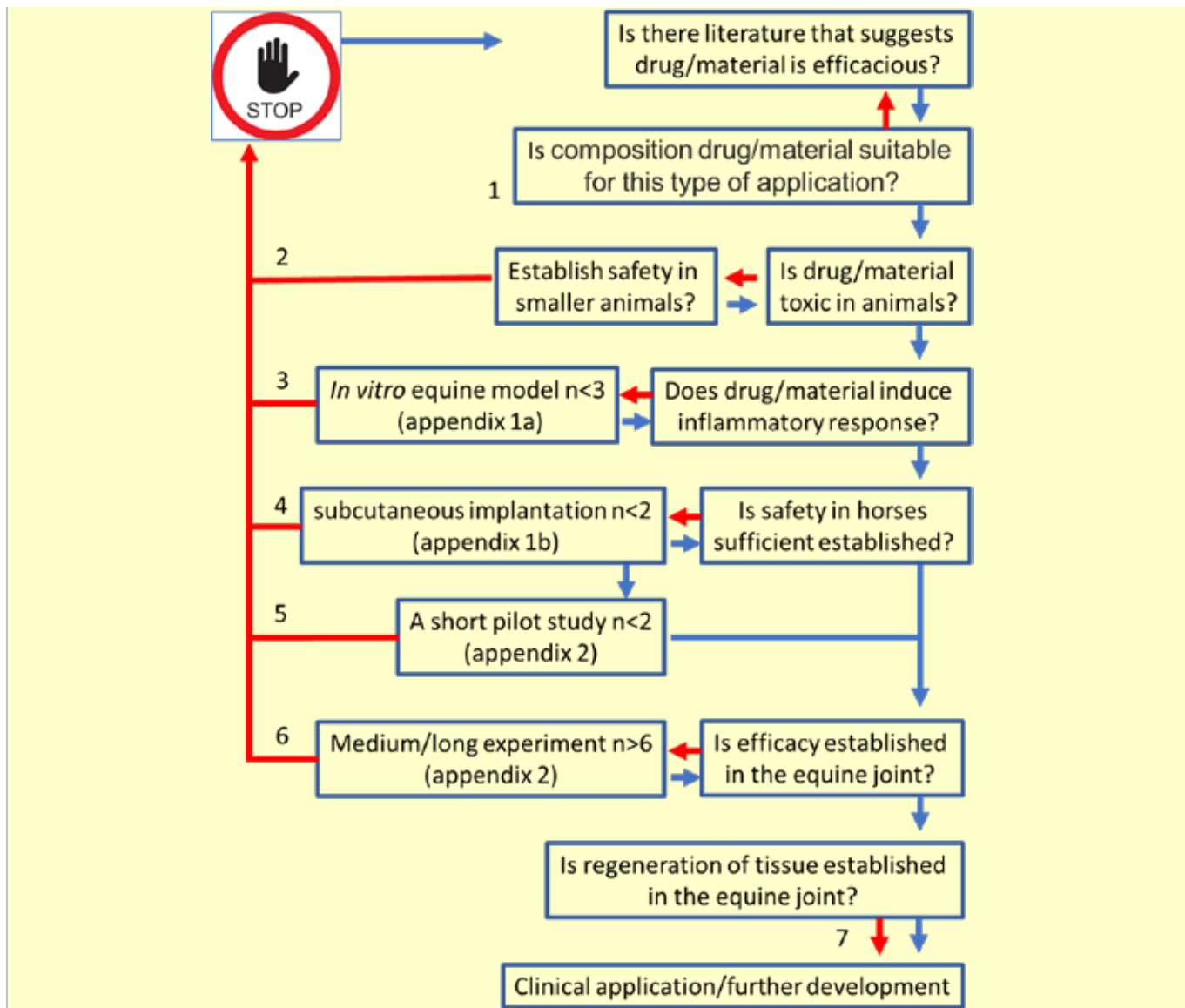
Industry: In collaboration with industry new treatments will be made available to the market. This procedure can be part of the preclinical research that leads to clinical application. We are involved in the preclinical work for multiple new treatments including those that are repurposed. If this preclinical work leads to a new clinical application industry may benefit by having a bigger sales market.

Experimental horses: The main negative effect is of course that after an experiment with the (osteo)chondral defect model the individual horses will be killed. The discomfort of the procedure has been classified as moderate, discomfort of the procedures used during the monitoring after the surgical intervention is generally light, rarely moderate. However, we cannot avoid handling and occasionally sedating the animals. The equine species as a whole will benefit from this procedure since one of the most important goals is to develop better treatment strategies for joint disease in equines.

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 current project is a vital part of a broader research line aimed at improving the treatment of joint disease. These experiments are part of multiple research lines, the first one is focusing on studies to explore the cellular basis of intrinsic cartilage repair and the role of biomechanics: This could be either stem cell populations residing in the joint but might also be chondrocyte subpopulations or alternative cell sources. Once identified we will aim at two strategies that can exploit these cell populations: I) development of bioactive (hybrid) scaffolds that in a cell-free manner offer the right biomechanical environment that will facilitate regeneration of the non-collagenous extracellular matrix of articular cartilage (as explained above) by activating these resident stem or progenitor cell populations; II) controlled release strategies that release bioactive components that activate the regenerative potential of these cells. Understanding the molecular basis of joint homeostasis by assessing the composition of synovial fluid may additionally lead to new diagnostics but also to new treatment strategies that can restore joint homeostasis. As part of this research line the LPS horse model of synovitis (AVD10800202013737) is also employed to evaluate treatment of joint disease in a more inflammatory condition and together with this project allows us to study joint disease of different origins.



The decision flowchart shows the process on how to proceed after each step. Go/No go decision will be carefully assessed in an interdisciplinary team. Positive results (blue) and negative results (red) are indicated by arrows.

1-2) The design phase: The direct translational nature of this project is to assess the clinical potential of novel (bio-)material approaches to repair damage to cartilage and bone. We work closely with academia and industry to develop various types of materials, such as hydrogels, cartilage-like printed or cast materials, and materials to replace bone, which can serve as an anchor to fix the cartilage materials in place. These materials undergo first testing in the lab to ensure that cartilage/bone cells can grow and produce the correct matrix, and/or that they show physical properties similar to cartilage/bone. The materials may also contain cells such as stem cells or cartilage cells and are of course tested for the absence of cytotoxicity. Further, in cases where there is doubt about the physical robustness of given materials and/or their retention in defects under biomechanical loading (most often in cases of sealing gel approaches for defects in the cartilage layer only), *ex vivo* tests using cadaver specimens can be carried out. For example, een toelichting/ voorbeelden willen zien in welke stap(pen) het onderzoek (of de verschillende te testen interventies bij een hybride aanpak)

3) To minimize the risk of adverse reactions, we can perform safety studies *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* in horses or with horse material. One of the tests includes taking whole blood from the animals to be studied and testing for individual immune responses to the materials (**appendix 1a**). For example, een toelichting/ voorbeelden willen zien in welke stap(pen) het onderzoek (of de verschillende te testen interventies bij een hydride aanpak)

4) Material/drug will only be further developed if all individual components have been deemed non-toxic based on experiments using other species. The safety in equines of novel treatments and materials is crucial in ensuring successful outcomes in clinical applications. Before proceeding, subcutaneous safety tests can be conducted, particularly if the material or component has not been tested before in large animal models or horses (**appendix 1b**). The decision to proceed is based on minimal tissue reaction, cellular infiltration, and cellular responses. For example, een toelichting/ voorbeelden willen zien in welke stap(pen) het onderzoek (of de verschillende te testen interventies bij een hydride aanpak)

5) We proceed with the model of surgically induced (osteo)chondral defects (**appendix 2**), typically in the stifle (knee) joint, although other joints and bones may be selected. Multiple defects can be created in multiple joints to test more than one treatment/control in one animal and enable the animal to serve as its own control. After an incubation period, dependent on the research question, we euthanize the animals to assess the quality of the repair tissue. The primary outcome parameter is the evaluation of the repair tissue and the surrounding native tissue using histology and immunohistochemistry, along with other techniques such as RNA analysis, biomarker analysis, and biomechanical analysis, of which the last one is of very great importance as the biological function of articular cartilage is almost 100% biomechanical and the biomechanical properties of the tissue that is formed are hence determining for functional repair or regeneration. During the experiment, we may, depending on the length and specific purpose of the study, use imaging, arthroscopy, arthrocentesis for tapping of synovial fluid for biomarker analysis, and gait analysis at regular intervals to monitor the healing process. The decision to proceed is based on the behavior of the biomaterial *in situ* and the reaction of the surrounding tissue. For high-risk approaches, a short pilot study (max 6 weeks) may be necessary and is assessed on a case-by-case basis by a team of experts. If the results of the short pilot study or safety study show promise, the Go/No go decision will be carefully assessed in an interdisciplinary team. For example, een toelichting/ voorbeelden willen zien in welke stap(pen) het onderzoek (of de verschillende te testen interventies bij een hydride aanpak)

6) Next we proceed to a medium/long-term study to assess regeneration/repair of tissue, which may last for a variable period (max 24 months), depending on the research question. This would be a fully powered study using the model of surgically induced (osteo)chondral defects (**appendix 2**). Depending on the expected results a golden standard is taken along in one of the other joints. By doing this even if there is no full tissue recovery the experiment could still help develop better symptomatic treatments. If this long-term study shows promising results, this may lead to clinical applications or further development/improvement of the treatment approach, prompting evaluation according to the flow-chart. For example, een toelichting/ voorbeelden willen zien in welke stap(pen) het onderzoek (of de verschillende te testen interventies bij een hydride aanpak)

7) Overall, the safety and feasibility of novel treatments and materials are critical considerations that must be carefully evaluated and monitored throughout the research process. After a long-term study we either establish efficacy, tissue regeneration or increase our knowledge on the process of tissue homeostasis. After a long-term experiment the drug/material will either be further developed, canceled or tested in patients depending on outcome. If efficacy was been shown (at least signs of a normal/healthy joint function) we will go towards clinical testing. If treatment shows better results than the gold standard, the drug/material will be further developed or go towards clinical testing. If no effect has been established compared to golden standard the drug/material will be further developed. If after the histological evaluation of the surrounding tissue, tissue damage is worse than golden standard the development of the drug/material is discontinued. All experimental data using live animals is shared with the scientific community either through peer reviewed publication or made available through open science depositories.

To illustrate the cascade with a concrete example:

If we take as an example the development of a complex, acellular or cell-seeded osteochondral construct following the hybrid approach explained earlier, we will in this phase which bone anchor will be chosen, how we will attach which type of fibrils will be used for reinforcement and how they will be firmly attached to the bone anchor, which gel will be printed to fill up the space between the fibrillar structure that itself will be produced by melt electrowriting and which cells that gel will contain (**step 1**). Once this has been decided, we have an overview of all biomaterials that will be used, as well as of the cell type. For the biomaterials it will be checked which materials have earlier be used successfully in the horse and which not. Materials that have not been used before in animals at all (which is almost never the case) will first be submitted to routine testing in small animals (**step 2**). Materials that have been tested before in other species, but not in the horse (which is more common) will first be tested with a blood test (**step 3**) to see whether they provoke any immune response. If the outcome is favorable, they will normally also be checked for their inflammatory potential in the horse through the subcutaneous test (**step 4**). Once this procedure has been finished for all biomaterials (in practice the number of materials to be tested is limited, as many materials have been used before in the horse and found to be safe, further improvements in structure and form of the constructs do not need new material testing sessions), the construct, if cell-free, is in principle ready for implantation. If there are essential differences in design that may affect for instance retention once implanted compared to earlier successfully implanted constructs, first *ex vivo* testing will be performed to check for this (not depicted in the flow chart). If not, the construct will be implanted in a pilot using a limited number of animals (**step 5**) to check for short-term retention or any unforeseen phenomena that can be supposed to affect long-term construct survival. If short-term efficacy is fine, the full long-term (normally 6-12 months) study in a well-powered (usually 8 animals, see also appendix) can be started (**step 6**). If the outcome of that study is favorable in terms of the pre-established outcome criteria (**step 7**), further development towards clinical translation can be started.

If the construct will be a cell-seeded construct, the procedure for the construct is the same. For osteochondral constructs in the horse either autologous chondrocytes or autologous mesenchymal stem cells are used, which do not pose an issue, or articular cartilage progenitor cells (specific stem cells extracted from articular cartilage). These latter cells are allogenic have been proven (as many stem cells, there is even an EMA-approved allogenic (mesenchymal) stem cell product for intra-articular application in horses on the market) to be non-immunogenic. They can be expanded quite easily and we have them in stock. Use of these cells also does not require specific requirements.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Novel treatments/materials will already have been tested *in vitro* for repair potential, as this is a standard and efficient way to evaluate the biological and mechanical properties of a material before *in vivo* testing. In addition, feasibility studies (for instance, to test if a material can be implanted and stays in place) can be performed, as pointed out above, in an *ex vivo* situation using joints obtained from cadaver material, which allows for more realistic testing of the material in a joint environment while minimizing the use of live animals. Materials will have been tested in small animal models or horses for their properties and safety, which helps to establish an initial safety profile of the material. If necessary, additional safety tests will be performed using equine cells (for instance from blood, synovia or cartilage) to further ensure safety and reduce the risk of adverse reactions in clinical applications.

(1-2) Go/No-go is based on existing literature and preliminary data of the drug/material should have the potential to either regenerate or functionally replace the original tissue (design phase). Regeneration potential is defined as a tissue (cartilage or bone) starts producing biomarkers that are associated with healthy tissue upon exposure to the therapy. Functionally replacement is defined as the artificial tissues show similar (bio)mechanic properties as the target tissue. If the drug/material has never been tested in a live animal this needs to be done first or step 3 and 4 (of the decision flowchart shown above) need to be performed before proceeding to step 5.

(3) Go/No go decision will be made based on previous data in other species or whole blood testing (appendix 1a). In the lab we will compare the response of whole blood to the drug/material to the LPS

(1ng/ml) induced chemokine response of whole blood. For most drug/materials a similar response in chemokines suggests the presence of pyrogens. Further development is then needed before *in vivo* testing.

(4) Go/No-go decision will depend on the material and research goal, but it will generally include minimal cellular responses (for example the % of polymorphonuclear leukocytes and systemic CRP) and no sign of other adverse reactions (necrotic tissue). Subcutaneous implantation studies can be performed if there is no data to exclude this in the literature to rule out an adverse reaction *in vivo*, as this allows for a quick and cost-effective assessment of the general biocompatibility of the material. In case of the unlikely event of sepsis or tissue necrosis, the experiment is stopped and the horse is treated. After that, the development goes back to the design phase. Signs of sepsis or tissue necrosis are defined in appendix 1. In short: first sign of sepsis is fever symptoms after the procedure (based on vital signs and behavior). Signs of possible necrosis are: rapidly spreading redness from the wound, focal rise in temperature near the wound, skin blisters, and grayish, smelly liquid draining from the wound

After safety and feasibility are sufficiently established, the novel treatments will be tested in the (osteo)chondral model. This model allows for a more comprehensive *in vivo* evaluation of the material's ability to repair joint damage and promote tissue regeneration, as it involves creating a controlled defect in the joint and filling/covering it with a biomaterial. A control will be included for comparison, which is necessary to demonstrate the superiority of the novel treatment over existing treatments or no treatment.

(5) Go/No-go decision will be made based on previous data in other species or after the appropriate safety study in equines. Either no toxicity or extreme reaction occurred after subcutaneous safety tests or toxicity of all individual components was deemed safe in other species and confirmed in equines in *in vitro* safety tests. If there are doubts on safety or the drug/ materials biomechanical properties are unclear within the context in the joint (different tissue) a short pilot study of a few weeks can be performed to assess if the novel implant/material is tolerated well in the joint, stays in place, does not interfere with the healing process (of the surgical site) and does not cause damage to the healthy native tissue. This initial assessment is necessary to ensure that the material is safe in the live situation and effective at the short term before conducting longer-term studies. In case of the unlikely event of sepsis or tissue necrosis, the experiment is stopped and the horse is treated. The joint tissues will be examined to provide a comprehensive assessment on whether the treatment is tolerated in the joint.

(6) Whether we perform a medium/long-term study design decision will be based on the predicted effect. To evaluate if the treatment results in better repair tissue, long-term studies of up to 24 months will be performed. To evaluate functional properties of the drug/material a medium-term study design of up to 6 months will be performed. After the surgery and recovery, the animals will be housed under standard conditions with normal or adjusted exercise for the remainder of the study period. The duration of this period will depend on the research question as it is known that the healing process and repair tissue will show different characteristics over time. During this period, non-invasive or minimally invasive evaluations (for instance radiographical or locomotion analysis) will be performed at predetermined intervals. This is important to monitor the progression of the healing process and evaluate the efficacy of the treatment in promoting tissue regeneration.

(5-6) At the end of the study, the animals will be euthanized and the joint tissues will be examined to provide a comprehensive assessment of the treatment's efficacy. Before the procedure starts the milestones and primary outcome parameter will be selected by an interdisciplinary team (team includes at least a researcher and veterinarian). The hypothesis will be formulated before the start of the project and includes primary outcome parameter thresholds. This has to be done based on the specific project due to the different tissues affected and sub-goals. For example treatment targeting cartilage might affect biochemistry markers and treatment targeting bone the tissue biomechanics.

During the experiments, arthroscopic imaging, gait analysis, and biomarker analysis (blood and synovial fluid) will be performed to gain insight into the ongoing repair process and to prevent suffering beyond moderate (if there are signs suffering goes beyond moderate the procedure is stopped and the animal treated). At the end of the study, the animals will be euthanized, and the joint tissues will be evaluated using

imaging, histology and tissue biomechanics, which are the primary outcome parameters. These parameters will provide insight into both the quality and functionality of the repair tissue and the influence of the treatment on the surrounding healthy tissues.

Specific outcome parameters can include histological analysis (H&E, Safranin O, picosirius red), micro-CT imaging or optical coherence tomography. Secondary endpoint parameters are immunohistochemistry (e.g., collagen types I, II, X, lubricin, COMP), biochemistry (proteoglycans, DNA, total collagen and cross-links), tissue biomechanics (Young's modulus, dynamic modulus), expression profiles via qPCR, and tissue metabolism via explant cultures. If a treatment results in better repair tissue or prevents degeneration of the healthy native tissue, we will proceed to clinical applications of the treatment, which is the ultimate goal of this research line.

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 | Safety studies |
| 2 | (Osteo)chondral defect model |
| 3 | Click or tap here to enter text. |
| 4 | Click or tap here to enter text. |
| 5 | Click or tap here to enter text. |
| 6 | Click or tap here to enter text. |
| 7 | Click or tap here to enter text. |
| 8 | Click or tap here to enter text. |
| 9 | Click or tap here to enter text. |
| 10 | Click or tap here to enter text. |



Appendix 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 (0900-2800028).

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

| Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------|
| 1 | Safety studies |

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

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.

The safety of various implantable materials designed for the repair of cartilage and bone will be thoroughly evaluated in this procedure. Materials such as 3D-printed scaffolds, hydrogels, and polyurethane plugs, which have been assessed in the recent past, will be examined alongside other materials that have not been fully tested in horses before.

Go/No-go is based on existing literature and preliminary data of the drug/material should have the potential to either regenerate or functionally replace the original tissue (design phase). Regeneration potential is defined as a tissue (cartilage or bone) starts producing biomarkers that are associated with healthy tissue upon exposure to the therapy. Functionally replacement is defined as the artificial tissues show similar mechanistic properties as the target tissue. If the drug/material has never been tested in a live animal this needs to be done first or Safety studies (this appendix) need to be performed before proceeding to (Osteo)chondral defect model (appendix 2).

In vitro tests (Groen et al. 2020) will be conducted using whole blood obtained from healthy horses. In short: whole blood is tapped and diluted with medium solution after which its exposed to the drug/material for 24 hours in the laboratory. The tests will measure cell vitality (using a dye that stains dead cells under the light microscope) and immune responses. We will use the Lipopolysaccharide (LPS) induced chemokine response of the same donor whole blood as a reference. In general the chemokine levels of whole blood that's in contact

with the drug/material should never exceed that of whole blood exposed to 1ng/ml LPS. If this is the case the drug/material most likely triggers the innate immune response and the design should be reconsidered.

Go/No go decision will be made based on previous data in other species or whole blood testing (appendix 1a). In the lab we will compare the response of whole blood to the drug/material to the lps (1ng/ml) induced chemokine response of whole blood. For most drug/materials a similar response in chemokines suggests the presence of pyrogens. Further development is than needed before in vivo testing.

Subcutaneous implantation tests can be performed, in short: under standing sedation horses will be implanted subcutaneous, materials will be implanted in the neck or chest area of a horse (max of 6 small implants. max duration 14 days), appropriate sedation and pain medication will be given before during and after the procedure. As the main outcome parameters include histological analysis (H&E) after 24 hours (Total polymorphonuclear leukocytes infiltration numbers compared to non-implanted tissue should be <30% increased) and tissue reactions (swelling, hotness compared to baseline) will be assessed. If an adaptive immune response is to be expected up to 14 days after implantations mononuclear leukocytes infiltration (Total cell number compared to non-implanted tissue should be <30% increased) should be assessed as primary outcome parameter. If this is the case the drug/material most likely triggers the immune response and the design should be reconsidered. In case of the unlikely event of sepsis (Fever, high peripheral CRP values) or tissue necrosis (festering open wound at the site of implantation) the experiment ends directly and development goes back to the design phase. Decision will be made by veterinarian on call and treatment is either euthanasia or removing the implants.

Go/No-go decision will depend on the material and research goal, but it will generally include minimal cellular responses (for example the % of Polymorphonuclear leukocytes and systemic CRP) and no sign of other adverse reactions (necrotic tissue). Subcutaneous implantation studies can be performed if there is no data to exclude this in the literature to rule out an adverse reaction in vivo, as this allows for a quick and cost-effective assessment of the general biocompatibility of the material. In case of the unlikely event of sepsis or tissue necrosis the experiment is stopped and horse is treated. After development goes back to the design phase. In short: first sign of sepsis is fever symptoms after the procedure (basses on vital signs and behavior). Signs of possible necrosis are Rapidly spreading redness from the wound; Warmth near the wound; Skin blisters; Grayish, smelly liquid draining from the wound

Before the start of the project specific go/no go criteria will be made based on the experiment's goals and will involve consultation with a team of experts, including clinicians and researchers. This needs to be evaluated and finetuned on a project specific basses due to the different pipelines/targets of these projects. For example for cartilage regeneration, minimal inflammatory response will be required, whereas some inflammation may be beneficial for bone regeneration. The safety tests may influence the selection of the most suitable material for implantation. Overall, this procedure aims to comprehensively evaluate the safety of various implantable materials for the repair of cartilage and bone. The outcomes will inform the selection of materials for future clinical use and contribute to the development of safer and more effective treatment options for bone and cartilage injuries.

References:

- Groen, W.M.G.A.C., Lizette Utomo, L., Castilho, M., Gawlitta, D., Malda, J. van Weeren, P.R., Levato, R., Korthagen, N.M. (2020) Impact of endotoxins in gelatine hydrogels on chondrogenic differentiation and inflammatory cytokine secretion in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* 21(22), 8571; <https://doi.org/10.3390/ijms21228571>.

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

a) For the *in vitro* assay, a small amount of blood (10-50 ml) will be obtained from institution-owned resident horses in the clinic. The institution-owned resident horses will be used for teaching proposes (AVD10800202013735) and blood drawing for biocompatibility tests (AVD10800202013737). To prevent over exposure the selection of the horses is in close coordination with the clinical staff to ensure they are not used for too frequently. The mild nature of the procedure (drawing of blood) animals will not be euthanized but always reused.

b) During subcutaneous implantation, materials will be implanted Under standing sedation in the neck or chest area of a horse, after appropriate sedation and pain medication. To reduce the number of experiments up to max of 6 implants may be performed. Negative and positive controls will be used when possible within the same animal. Subcutaneous implantation will take a few days to a few weeks (max 14 days) harvesting of the tissues will take place when the animals are under general anaesthesia or dead. When cellular infiltration (on histology) results are not one of the outcome parameters (10% of the experiments), but the outcome parameters are only externally visible tissue reactions (swelling, hotness), animals will not be euthanized but implants removed under standing sedation. It is worth noting that these horses are generally animals that are destined for the (terminal) periodical surgical education practicum (AVD10800202013735) and until now (in the last five years) have never been acquired for solely subcutaneous implantation.

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

a) To obtain reliable results for the *in vitro* evaluation, blood from three different animals is usually sufficient, including an assessment of intra-individual differences. We have not encountered horses whose blood did not respond to a positive stimulus (LPS) at all, but there can be low and high responders. Based on previous *in vitro* experiments we have identified institution-owned resident high responders and will include at least one of those in our test. We will always preform triplicates and compare the chemokine response of the whole blood to the drug/material to the LPS induced chemokine response within that donor. Statistical significance is generally not required at this stage, but it can be determined since the data is paired. We expect to perform this assay twice in the preparatory/discovery phase before evaluating a new drug/material. Based on previous years we expect to preform 10 of these *in vitro* tests.

b) Previous experience has shown that one animal is typically sufficient to assess safety *in vivo* when combined with the *in vitro* and *ex vivo* safety tests. This is because multiple drug/materials can be evaluated in a single animal, and appropriate positive and negative controls can be included. If there is any uncertainty about the results, the test can be repeated, such as if the response to the material is undeterminable or if the positive or negative results do not match the expected outcomes based on *in vitro* experiments. However, using only one animal is generally sufficient, and this approach will minimize the number of animals used.

Based on previous years we would expect 10 of these experiment however as previously mentioned two of our drug/treatments yielded some promising sort term results.

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 | Adult equus caballus | commercial or re-use | 3 years or older | 30 for blood collection (a) 10 subcutaneous implantation (b) | male or female | no | Horses or ponies |

Provide justifications for these choices

| | |
|---------|--|
| Species | Adult equus caballus (horses or ponies) In horses, joint disorders severely affect equine welfare. The similarity between humans and horses with respect to the impact of joint disorders in general and OA specifically, the recognition of the strong resemblance of both joint biology and the prevailing pathologies and the existence of a huge and as yet unmet clinical need for effective treatment of degenerative joint disorders in both species has led to the recognition of the horse as one of the large animal models appropriate for assessing the effects of new therapies for cartilage repair or replacement. Other species |
|---------|--|

| | |
|---------------------|--|
| | often used in joint disease research like goats and sheep are rarely kept for their locomotor capacity and therefore the incentive to treat joint disease in these species is low compared to equines. There also a special mention of the similarity of human and equine joints, especially the knee joint and the biomechanical environment in an equine joint approaches the human situation much better than the classic smaller laboratory species. Artificial joints are currently not available for horses and in humans these artificial joints wear out (maximum lifespan of 20 years). This research therefore focuses on testing specialized drugs or materials that have been developed to permanently repair cartilage and/or bone damage, making long-term movement without pain possible. |
| Origin | Animals will be purchased via normal commercial routes, however, only using long-standing suppliers with a known track record of responsible and fair trading. We strive to use the intended clinical population and re-use horses as much as possible. |
| Life stages | 3 years or older, since these would also represent the intended clinical population. |
| Number | 40, 30 for blood collection (a) 10 subcutaneous implantation based on the previous year's 10 new drug/treatments were selected but not deemed safe enough to preform a full scale (Osteo)chondral defect model experiment. |
| Gender | No preference for male or female they should represent the intended clinical population. In humans there is an association with joint disease and sexes but in horses this has not been shown |
| Genetic alterations | - |
| Strain | - |

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

Animals will be housed in large (4X4m) individual boxes that permit close tactile, visual, auditory and olfactory contact with other horses and will be given regular exercise, either in a horse-walker or free exercise in the field, depending on climatic conditions. For longer studies, animals can often be housed out in the field, in groups, for at least a part of the total experiment.

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.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Lidocaine or similar depending on the research question, is locally injected before implantation. Post-implementation meloxicam is given orally q24h as long as indicated with a maximum of 14 days. If deemed necessary, this treatment is supplemented by treatment with tramadol (orally q12h, as long as indicated with a maximum of 14 days).

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

Adverse local or systemic responses to the implanted material may occur. If multiple drugs/material have been implanted all need to be evaluated again in the case of an systemic response. If systemic responses are detected, local effects are also to be expected allowing the most likely candidate that causes this systemic effect. Drug/material should all be retested *in vitro*, more specifically the drug/material of that batch needs to

be compared to previously tested similar drug/materials in parallel. Based on these results (was it a batch effect or do equines react strongly to one of the drug/ materials) the experiment can be repeated only if the likely cause is found for this reaction. This result is discussed by an interdisciplinary team if the cause of the response cannot be found the materials cannot be implanted in this formulation thereby preventing it to be implanted in the joint. Furthermore implantation always carry a risk for infection and adverse reaction to sedatives, anaesthetics or other chemical compounds used.

Explain why these effects may emerge.

These individual responses cannot completely be excluded beforehand.

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

In vitro Studies for toxicity and biocompatibility will have been performed prior to implantation and treatment/analgesia will be available in the case of discomfort.

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.

We do not expect the experiments described in this procedure to lead to reaching a humane endpoint (HEP). We monitor the animals every two hours in the first 8 hours and twice daily in the first week after implantation, determining vital parameters such as heart rate, respiratory rate, body temperature and nutritional behavior, which makes it possible to anticipate any condition of moderate discomfort and immediately take action. If the horse's condition does not improve after a maximum of 3 days HEP is reached.

If extreme adverse reactions or infections occur due to the implantation of a material. HEP is reached if the animal develops septic arthritis or signs of necrosis at the site of implantation/injection. The presence of septic arthritis is based on clinical parameters principally fever symptoms, peripheral blood WBC and CRP values. Culture of wound fluid may give additional information (presence of immune cells and /or bacteria). If there is discussion regarding whether HEP is reached, the veterinarian on call will in that case make the decision. Signs of necrosis at the site of implantation/injection are visible on a macroscopic level and sometimes smell and should be very clear, in this case HEP is reached.

Indicate the likely incidence.

From experience we do not expect the HEP to be reached in any of these procedures. Since it has not happened in the last five years no percentage can be supplied.

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).

Based on our experience, we do not expect any of the procedures to lead to more than mild discomfort. Furthermore pain relieving methods will not interfere with our outcome parameters as long as anti-inflammatory medication is not used therefore at any moment pain relieving medication can be administered if necessary to prevent moderate discomfort .

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 | Testing materials extensively <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> prior to use in the horse will ensure minimal risks of adverse reaction with minimally invasive methods. Performing further <i>in vivo</i> safety studies are necessary to exclude tissue interactions and to check for safety and species-specific biocompatibility. |
| Reduction | These subcutaneous safety studies will mostly be performed in animals that are destined to be used for education purposes, thus reducing number of total animals used at the department. Where possible, treatment and control groups will be included in the same animal to allow the animal to serve as its own control. |

| | |
|------------|---|
| Refinement | Horses will be housed in high-quality stables, in individual stalls (but permitting contact with other horses), as this is the standard mode of housing these animals. Depending on character and duration of the study animals are housed in a group and, depending on climatic conditions, outside. We prefer to house the animals outside and in groups therefore we will plan our bigger studies accordingly. Ponies are housed in groups, both indoors and outdoors. |
|------------|---|

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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.

All animals that are being reused will be selected in close coordination with the clinical staff to ensure they are not used for teaching or research too frequently. Animals will only be reused after set recuperation time and if the previous procedure was considered mild.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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.

3. 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.

(No) For the *in vitro* assay, a small amount of blood (10-50 ml) will be obtained from horses. Outcome parameters will be based on inflammatory and toxicity parameters acquired *in vitro* and due to the mild nature of the procedure (drawing of blood) animals will not be euthanized and reused.

(Yes) For the subcutaneous implantation most animals will be euthanized since histology needs to be performed on the surrounding tissue. When cellular infiltration (on histology) results are not one of the outcome parameters (10% of the experiments), but only externally visible tissue reactions (swelling, hotness), animals will not be euthanized and reused.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

No > Describe the method of killing.

The method as mentioned in Annex IV of Directive 2010/63/EU used for euthanizing the animals will be the one using an anaesthetic overdose. Prior sedation and induction will be performed as reported under the surgical procedure. After this, the animals will receive an overdose of euthesate.

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.

N.A.



Appendix 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 (0900-2800028).

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> | Serial number | Type of animal procedure |
| | 2 | (Osteo)chondral defect model |

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.

In this procedure, we will assess different drugs or implantable materials that are designed for the repair of cartilage and bone. We do that in a staged fashion, in which *in vitro* and *ex vivo* work leads up to final *in vivo* testing. Typically, we perform a maximum of two complete studies per year because this is the maximum number that our facility can manage logistically, based on our experience in recent years.

After safety tests (see **appendix 1a** and **1b**) or if safety was established in other species and equine *in vitro* testing, we will evaluate the materials using a model in which chondral or osteochondral defects are created, usually in the stifle (femoropatellar) joint. However, other sites may also be used taking into consideration both practical and scientific arguments. Two defects are typically created per joint, in the left and right joints. The defects are then filled with the drug/material (or composite materials) under investigation, and an appropriate control is included, depending on the research question. The creation and filling of the defects are performed during a single surgical procedure to avoid multiple procedures.

After surgery, the animals will be housed for a predetermined period that depends on the research question, but may last up to 12 months, knowing that long-term assessment is necessary in studies on joint repair (Vindas Bolanos et al. 2017). During this time, arthroscopic imaging, gait analysis, and biomarker analysis (blood and synovial fluid) will regularly be performed to gain insight into the ongoing repair process. At the end of the study, the animals will be euthanized, and the joint tissues will be evaluated using imaging, histology and tissue

biomechanics, which are the primary outcome parameters. These parameters will provide insight into both the quality and functionality of the repair tissue and the influence of the treatment on the surrounding healthy tissues.

Specific post-mortem outcome parameters include histological analysis (H&E, Safranin O, picrosirius red), micro-CT imaging or optical coherence tomography. Secondary endpoint parameters are immunohistochemistry (e.g., collagen types I, II, X, lubricin, COMP), biochemistry (proteoglycans, DNA, total collagen and cross-links), tissue biomechanics (Young's modulus, dynamic modulus), expression profiles via qPCR, and tissue metabolism via explant cultures (Nykänen et al. 2019; Mancini et al. 2020; De Ruijter et al. 2023).

References:

- Mancini, I., Schmidt, S., Brommer, H., Pouran, B., Tessmar, S., Mensinga, A., van Rijen, M., Groll, J., Blunk, T., Levato, R., Malda, J., van Weeren, P.R. (2020) A composite hydrogel-3D printed thermoplast osteochondral anchor as an example for a zonal approach to cartilage repair: from in vitro development to long-term implantation in an equine model. *Biofabrication*, Jul 1;12(3):035028. doi: 10.1088/1758-5090/ab94ce.
- Nykänen, O., Sarin, J.K., Ketola, J., Leskinen, H., Tiitu, V., te Moller, N.C.R., Mancini, A.D., Visser, J., Brommer, H. van Weeren, P.R., Malda, J., Töyräs, J., Nissi, M.J. (2019) T2* and quantitative susceptibility mapping in an equine model of post-traumatic osteoarthritis: assessment of mechanical and structural properties. *Osteoarthr. Cart.*, **27**(10):1481-1490. doi: 10.1016/j.joca.2019.06.009.
- De Ruijter, M., Diloksumpan, P., Dokter, I., Brommer, H., Smit, I.H., Levato, R., van Weeren, P.R., Castilho, M., Malda, J. (2023) Orthotopic equine study confirms the pivotal importance of structural reinforcement over the pre-culture of cartilage implants. *Bioeng. & Translat. Med.*, 2023;e10614. <https://doi.org/10.1002/btm2.10614>
- Vindas Bolaños RA, Cokelaere SM, Estrada McDermott JM, Benders KE, Gbureck U, Plomp SG, Weinans H, Groll J, van Weeren PR, Malda J. The use of a cartilage decellularized matrix scaffold for the repair of osteochondral defects: the importance of long-term studies in a large animal model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 Mar;25(3):413-420.

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

The equine osteochondral model for cartilage repair, as described in the literature (McIlwraith et al., 2011; Vindas Bolaños et al., 2017), consists of performing an arthrotomy to create a series of (osteo)chondral defects (per joint, max 4 full or max 10 partial thickness) in weight-bearing/non-weight-bearing areas of the cartilage of the femoropatellar or femorotibial joint. Micro-fracturing, a technique that is clinically often used and that enhances fixation and allows bone marrow components access to the repair site, can be executed as a standard-of-care treatment to compare with (control), depending on the research question. Strategies for fixation will be dependent on the materials to be tested (i.e., porous materials may be fixed with fibrin glue, osteochondral scaffolds are mostly positioned press-fit).

Feasibility will be assessed through short-term pilot studies (2-6 weeks), involving a limited number of animals (1-2), if necessary. These pilots will also allow for early degradation and performance assessment of materials. Materials will then be tested in medium/long-term studies to assess regeneration/repair of tissue, which may last for a variable period of 3-24 months, depending on the research question. As pointed out above, long-term assessment (max 24 months) is necessary for the assessment of joint repair strategies. After surgery, horses will be box rested to allow healing of the surgical wound for a short period (2-4 weeks) and then either taken out in the field or be subjected to a well-quantified workload, using horse walkers and/or a high-speed treadmill.

The animals will be routinely clinically monitored and in most cases regular (quantitative) assessment of gait quality will take place. Other non-invasive monitoring will be achieved through regular clinical assessment and radiographs at various time points. Direct visualization of the healing process using techniques for tissue visualization (such as optical coherence tomography and ultrasound and mechanical assessment of the tissue with help of indenters) and biopsy by arthroscopy may be performed at preset intervals (max of 1 procedure per joint with a 13 day interval). Regular taps of synovial fluid (max of 2 times per joint with interval of 6 days) with subsequent biomarker analysis may be performed. At the end of the study the horses will be euthanized so that tissues can be analyzed.

References:

- McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of micro-fractured chondral defects. *Arthroscopy*. 2011 Nov;27(11):1552-61.
- Vindas Bolaños RA, Cokelaere SM, Estrada McDermott JM, Benders KE, Gbureck U, Plomp SG, Weinans H, Groll J, van Weeren PR, Malda J. The use of a cartilage decellularized matrix scaffold for the repair of osteochondral defects: the importance of long-term studies in a large animal model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 Mar;25(3):413-420.

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

The maximum number of animals allowed in these studies is 8, based on statistical calculations from a previous study involving 4 groups and a randomized ANOVA with Bonferroni correction. A statistician from the Julius center at UMC Utrecht determined that a sample size of 8 animals yields a power of 94%, while a sample size of 6 animals yields a power of 80%, with a p-value less than 0.01. This calculation is based on the detection of histological differences between zonal and non-zonal conditions in cartilage repair, with no expected interference between the groups.

The number of animals required for this type of study per group is 6-8. We have experienced that the risk of loss of animals due to complications during or after surgery, such as reactions to anesthesia is not more than in any sound horse that is brought under anesthesia for an elective intervention (<1%), but is of course not non-existent. Further, there may be unrelated complications (10%) that may occur during long-term experiments, such as the development of lameness and the occurrence of infections unrelated to the study. For this reason, we generally include 8. Before every experiment a power calculation will be performed. If the power analysis indicates that in given experimental set-ups, the number of animals required needs to be adjusted, this will be done so accordingly. However, if the power analysis indicates that more than 8 animals would be needed, the study will not be conducted because the effect size would be too small to have sufficient clinical relevance.

We prefer to use ponies rather than horses in this type of study because they are logistically easier to deal with, including the possibility of group housing, which is preferred from the welfare perspective in this social species, and because of the better availability of healthy and able-bodied animals for a reasonable price. From an animal welfare perspective, ponies seem to recover faster from surgery compared to horses (McIlwraith et al 2011, Husby et al 2016). In a scientific sense, ponies come closer to humans in terms of weight and hence are preferable in a translational sense. As a model for the equine species itself, it should be kept in mind that ponies are just variations within the same species with a rather arbitrary height at the withers of 14½ hands (1.47m) being the sole discriminant. Interbreed differences are much less than in a species like the dog and there is no reason to assume they cannot represent the species. Ponies or other small horses have frequently been used successfully to evaluate Osteochondral Implants by our group in the past [REDACTED]

References:

- Diloksumpan, P., Abinzano, F., de Ruijter, M., Mensinga, A., Plomp, S., Khan, I., Brommer, H., Smit, I., Castilho, M., van Weeren, P.R., Malda, J., Levato, R. (2021) The Complexity of Joint Regeneration: How an Advanced Implant could Fail by Its In Vivo Proven Bone Component. *J. of Trial and Error*, published March 23, 2021, <https://doi.org/10.36850/e3>.
- Husby KA, Reed SK, Wilson DA, Kuroki K, Middleton JR, Hoepf NC, Charles EM, Cook JL. Evaluation of a Permanent Synthetic Osteochondral Implant in the Equine Medial Femoral Condyle. *Vet Surg*. 2016 Apr;45(3):364-73. doi: 10.1111/vsu.12453. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26909761.
- Korthagen NM, Brommer H, Hermsen G, Plomp SGM, Melsom G, Coeleveld K, Mastbergen SC, Weinans H, van Buul W, van Weeren PR. A short-term evaluation of a thermoplastic polyurethane implant for osteochondral defect repair in an equine model. *Vet J*. 2019 Sep;251:105340. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.105340. Epub 2019 Jul 20. PMID: 31492385.
- McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of micro-fractured chondral defects.

Arthroscopy. 2011 Nov;27(11):1552-61.

- De Ruijter, M., Diloksumpan, P., Dokter, I., Brommer, H., Smit, I.H., Levato, R., van Weeren, P.R., Castilho, M., Malda, J. (2023) Orthotopic equine study confirms the pivotal importance of structural reinforcement over the pre-culture of cartilage implants. *Bioeng. & Translat. Med.*, 2023;e10614. <https://doi.org/10.1002/btm2.10614>
- Vindas Bolaños RA, Cokelaere SM, Estrada McDermott JM, Benders KE, Gbureck U, Plomp SG, Weinans H, Groll J, van Weeren PR, Malda J. The use of a cartilage decellularized matrix scaffold for the repair of osteochondral defects: the importance of long-term studies in a large animal model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017 Mar;25(3):413-420.

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 |
|---------------|----------------------|--|------------------|--------|---------------|---------------------|------------------|
| 2 | Adult equus caballus | Animals will be purchased via normal commercial routes, however, only using long-standing suppliers with a known track record of responsible and fair trading. | 3 years or older | 90 | no preference | no | horses or ponies |

Provide justifications for these choices

| | |
|-------------|--|
| Species | <p>Adult equus caballus (horses or ponies) In horses, joint disorders severely affect equine welfare. The similarity between humans and horses with respect to the impact of joint disorders in general and OA specifically, the recognition of the strong resemblance of both joint biology and the prevailing pathologies and the existence of a huge and as yet unmet clinical need for effective treatment of degenerative joint disorders in both species has led to the recognition of the horse as one of the large animal models appropriate for assessing the effects of new therapies for cartilage repair or replacement. Other species often used in joint disease research like goats and sheep are rarely kept for their locomotor capacity and therefore the incentive to treat joint disease in these species is low compared to equines. There also a special mention of the similarity of human and equine joints, especially the knee joint and the biomechanical environment in an equine joint approaches the human situation much better than the classic smaller laboratory species (Malda et al. 2013). Artificial joints are currently not available for horses and in humans these artificial joints wear out (maximum lifespan of 20 years). This research therefore focuses on testing specialized drugs or materials that have been developed to permanently repair cartilage and/or bone damage, making long-term movement without pain possible.</p> <p>Reference:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Malda, J., de Grauw, J.C., Benders, K.E.M., Kik, M.J.L. van de Lest, C.H.A., Creemers, L.B., Dhert, W.J.A., van Weeren, P.R. (2013) Of mice, men and elephants: the relation between articular cartilage thickness and body mass. <i>PLoS ONE</i> 8(2), e57683. doi: 10.1371/journal.pone.0057683. |
| Origin | Animals will be purchased via normal commercial routes, however, only using long-standing suppliers with a known track record of responsible and fair trading. We strive to use the intended clinical population and re-use horses as much as possible. |
| Life stages | 3 years or older, since these would also represent the intended clinical population. |
| Number | Estimated maximum number: 90 This is based on a maximum of 2 studies per year with a maximum of 2 animals for a pilot (50% of the cases necessary) and 8 animals for a medium/long-term study (2 horses x 5 pilot studies) + (8 horses x 10 medium/long-term studies)= 90. |

| | |
|---------------------|---|
| Gender | There are, unlike the situation in humans where knee OA is more prevalent in women than in men, to the knowledge of the authors, no data about nor indications of sex differences in horses with respect to either the incidence of OA or tissue characteristics of articular cartilage. There is, to the knowledge of the authors, also no anecdotal clinical evidence pointing in this direction. |
| Genetic alterations | Click or tap here to enter text. |
| Strain | Click or tap here to enter text. |

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

Animals will be housed in close contact with regular exercise. For longer studies, animals can be housed out in the field, in groups.

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.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The standard anaesthetic protocol consists of premedication with detomidine (Domosedan®) and morphine IV, induction with midazolam and ketamine (Narketan®) IV and maintenance using isoflurane in O₂ with a continuous rate infusion (IV) of detomidine and ketamine. As for pain medication, pre-operatively once meloxicam (Metacam®) and morphine and detomidine are given. For pain medication intra-operatively see above in the anaesthetic protocol. Post-operatively meloxicam is given orally q24h as long as indicated with a maximum of 14 days *post operationem*. If deemed necessary, this treatment is supplemented by treatment with tramadol (orally q12h, as long as indicated with a maximum of 14 days *post operationem*) and morphine via injection through an epidural catheter q12h as long as indicated with a maximum of 5 days *post operationem*). The last procedure is performed under sedation (detomidine).

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

Adverse local or systemic responses to the implanted material may occur. Furthermore surgeries always carry a risk for infection, and there is a risk of the anesthetic procedure in itself and anesthesia always carries a risk for adverse reactions to certain drugs used to sedate/induce/maintain anesthesia.

Explain why these effects may emerge.

These individual responses cannot completely be excluded beforehand.

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

Studies for toxicity and bio-compatibility will have been performed prior to implantation and treatment/analgesia will be available in the case of discomfort.

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.

Horses will be continuously monitored, on a daily basis by the researchers (Article 9) and the animal care takers under supervision of the researchers in the first week. Specifically monitoring twice daily determining vital parameters such as heart rate, respiratory rate, body temperature and nutritional behavior makes it possible to anticipate any condition of severe discomfort and take appropriate action either through medication or by immediate euthanasia. This procedure allows the use of proven objective criteria to reflect the horse's general condition and its pain perception and avoids reaching a status of severe discomfort. If the animal has a lameness score of 4/5 and this does not improve despite treatment within a maximum of 3 days, the animal will be euthanized. If the animal has a lameness score of 5/5 (non-weight bearing lameness) it will be euthanized immediately.

Lameness scale:

0: No lameness perceptible under any circumstances.

1: Lameness is difficult to observe and is not consistently apparent, regardless of circumstances (e.g. under saddle, circling, inclines, hard surface, etc.).

2: Lameness is difficult to observe at a walk or when trotting in a straight line but consistently apparent under certain circumstances (e.g. weight-carrying, circling, inclines, hard surface, etc.).

3: Lameness is consistently observable at a trot under all circumstances.

4: Lameness is obvious at a walk.

5: Lameness results in minimal weight bearing in motion and/or at rest or a complete inability to move.

HEP is reached if the animal develops septic arthritis. The presence of septic arthritis is based on clinical parameters principally fever symptoms, peripheral blood WBC and CRP values. Culture of synovial fluid may give additional information (presence of immune cells and/or bacteria). If there is discussion regarding whether HEP is reached, the veterinarian on call will in that case make the decision.

Indicate the likely incidence.

Not expected, <1%. In the previous 5-year period not a single animal was euthanized because of reaching a humane endpoint.

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).

In general for this appendix, we expect moderate discomfort due to the disruption of the horses homeostasis by putting them under full anesthesia. Based on previous experiments, after initial recuperation time of the surgery, lameness does not exceed 2 on the lameness scale and horses can be housed in groups. In our experience, the horses we use for the osteochondral model do not run a greater risk of serious postoperative complications than any other sound horse that is put under general anesthesia for an elective intervention (* <1%). Typically, these horses will be on their feet approximately 30 minutes after being transferred to the recovery box. Anyhow, the animals will be routinely clinically monitored during recovery. Might it nonetheless occur that the HEP will be reached, we will immediately act to prevent further suffering.

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 | This project aims to study joint disease in horses and because this includes interactions between tissues, the response to therapy and the effects on locomotion this can only be studied in live animals. Our research group has extensive contacts world-wide that ensure up-to-date knowledge on scientific developments in the field. Materials will have been tested <i>in vitro</i> in cell cultures or by using a blood test and/or <i>ex vivo</i> prior to use in the horse to ensure minimal risks of adverse reactions or chances of physical failure of the implant due to joint loading and/or joint motion. |
| Reduction | Short-term pilot studies and studies to check for safety and species-specific biocompatibility will be performed before larger studies are initiated. These pilot studies will mostly be performed in animals that are destined to be used for education purposes in a terminal experiment, thus reducing the total number of experimental animals used. Where possible, treatment and control groups will be included in the same animal to |

| | |
|------------|---|
| | reduce the effect of interindividual variation (which is quite large in an outbred species as the horse) and to allow the animal to serve as its own control. |
| Refinement | Horses will be housed in high-quality stables, in individual stalls (but permitting contact with other horses), as this is the standard mode of housing these animals. Depending on character and duration of the study animals are housed in a group and, depending on climatic conditions, outside. We prefer to house the animals outside and in groups therefore we will plan our bigger studies accordingly. Ponies are housed in groups, both indoors and outdoors. |

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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.

All animals that are being reused will be selected in close coordination with clinic staff to ensure they have not been used for teaching or research too frequently. Animals will only be reused after set recuperation time and if the previous procedures they were subjected to were considered mild. All reused animals should be clinically sound.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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.

3. 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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

All animals will be euthanized since histology is one of the key outcome parameters, both for assessment of the implanted scaffold or applied gel and for detailed analysis of the surrounding native tissues.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

No > Describe the method of killing.

The method as mentioned in Annex IV of Directive 2010/63/EU used for euthanizing the animals will be the one using an anesthetic overdose. Prior sedation and induction will be performed as reported under the surgical procedure. After this, the animals will receive an overdose of euthesate.

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.

N.A.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD10800202317438
2. Titel van het project : Osteochondral defect repair in the horse as target and translational species.
3. Titel van de NTS : Behandeling van beschadigd kraakbeen en bot bij paarden.

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: 29-09-2023
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 04-10-2023
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 11-10-2023 / 10-11-2023
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 23-11-2023

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 04-10-2023
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 6
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker (PI) en klinische onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de concrete opbrengsten uit dit langlopende onderzoek, het doel van het onderzoek en de humane eindpunten. 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: 11-10-2023

- Datum antwoord: 10-11-2023
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

De extra tekst, die is toegevoegd aan de documenten, is geel gearceerd in de aangepaste documenten

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond

- Kunt u kort de aansluiting beschrijven van dit nieuwe (vervolg) onderzoek (AVD10800202317438) met het huidige onderzoek (AVD1080020186885)? Dus wat het lopende onderzoek concreet heeft opgeleverd sinds 2018 en hoe u daar nu op voortborduur?

Antwoord: Het onderzoek richt zich al vanaf het genoemde moment op het ontwikkelen van een duurzame regeneratieve techniek voor het repareren van osteochondrale defecten in het gewricht. De rationale daarvoor is dat gewrichtsaandoeningen een groot klinisch probleem vormen bij vele diersoorten, waarbij ze bij het paard een zeer groot effect hebben op het welzijn en in feite de levensduur van de dieren, en ook bij de mens. Bij de mens leiden vaak op jonge leeftijd (sport) opgelopen osteochondrale defecten, indien niet behandeld, tot de ontwikkeling van post-traumatische osteoarthrose (OA) die niet anders behandelbaar is op termijn dan met behulp van implantatie van gewrichtsprotheses. Die functioneren doorgaans klinisch goed, maar hebben een beperkte levensduur en de vervanging door middel van revisiechirurgie is veel lastiger, kent een hoger percentage van mislukkingen en complicaties en is veel duurder. De combinatie van het steeds op jongere leeftijd optreden van OA door veranderingen in de levensstijl (o.a. resulterend in een sterke toename van obesitas) én de toegenomen levensverwachting, maakt de noodzaak tot het ontwikkelen van alternatieven waarmee de kunstgewrichten vervangen kunnen worden, dan wel de leeftijd van implantatie substantieel naar later opgeschoven kan worden steeds groter. Er is dus een duidelijke klinische behoefte aan het ontwikkelen van dit soort nieuwe therapieën vanuit zowel de diergeneeskunde (waar het paard een doeldier is) én in translationeel opzicht in de humane geneeskunde (waar het paard door de internationale wetenschappelijke wereld en regulerende instanties zoals de FDA gezien wordt als een goed modeldier).

Voor de ontwikkeling van dit soort nieuwe therapieën werken we al jaren nauw samen met de Biofabrication onderzoeksgroep van het UMCU die geleid wordt door Prof. Dr. Ir. Jos Malda (die overigens ook een deeltijdaanstelling bij onze onderzoeksgroep heeft). De Biofab groep is internationaal leidend in het ontwikkelen van nieuwe regeneratieve technieken door onder meer 3D Bioprinting en melt electrowriting (MEW) en ook worden meerdere technieken gecombineerd. Een osteochondraal implantaat bestaat uit een zogenaamd botanker dat in het subchondrale bot geplaatst wordt en een kraakbeenlaag die het oorspronkelijke kraakbeen moet vervangen. Voor beide elementen is een heel ontwikkelproces nodig geweest om ze a) via de genoemde technieken te kunnen produceren (het spreekt vanzelf dat voor het werken met

levende cellen bestaande 3D printtechnieken sterk aangepast dienen te worden) en b) ze zo goed mogelijk functioneel te maken. Het uiteindelijke doel is uiteraard een construct te maken dat op een duurzame manier een goede gewrichtsfunctie mogelijk maakt. Zo'n ontwikkeling heeft veel tijd en trial and error nodig. Veel kan daarbij in vitro of ex vivo gebeuren (en dat gebeurt ook), maar de uiteindelijke proof of the pudding is het langdurig (6 maanden of meer) implanteren in de real life situatie. Daar wordt het pony model voor gebruikt.

In de afgelopen 5 jaar is er veel voortgang geboekt. Met name de botfase is nu in een stadium dat een goede scaffold gemaakt kan worden die makkelijk implanteerbaar is en een goede verbinding met het omringende bot kan creëren waarbij in de loop der tijd de biomaterialen waarvan de scaffold gemaakt is vervangen worden door bot dat door het lichaam zelf aangemaakt wordt. Dat is geheel volgens het paradigma van de regeneratieve geneeskunde: je vervangt een lichaamsonderdeel door een biofabricaat dat over tijd geresorbeerd wordt en vervangen wordt door lichaamseigen materiaal. Het probleem met het structuur gevende deel van extracellulaire matrix van kraakbeen, het collageennetwerk, is dat dit regeneratieve paradigma niet opgaat (Malda et al. 2019). Er is namelijk aangetoond dat dit collageennetwerk bij volwassen individuen metabool inert is, onafhankelijk of er sprake is van gezond weefsel of enige vorm van pathologie (Heinemeier et al. 2016). Er is dus geen sprake van spontaan herstel. Dat compliceert het geheel behoorlijk en om die reden wordt er nu gekeken naar hybride oplossingen waarin de functie van het collageenskelet overgenomen wordt door vezels van een materiaalsoort die pas na lange tijd of helemaal niet geresorbeerd worden terwijl voor het overige deel van de extracellulaire matrix de standaardbenadering uit de regeneratieve geneeskunde wordt gebruikt.

De eerste resultaten daarvan zijn hoopvol: bij gebruik van polycaprolactone voor de vezels is het voor het eerst gelukt een scaffold te maken die na 6 maanden in een ponyknie dezelfde biomechanische eigenschappen had als op het moment dat deze geïmplanteerd werd (De Ruijter et al. 2023). Dat is een hele grote doorbraak. Omdat polycaprolactone nog steeds geresorbeerd wordt, zij het na een jaar of zo, wordt nu de volgende stap genomen om nieuwe materialen te gebruiken die een veel langere levensduur hebben om zo tot een duurzame hybrideoplossing te komen.

- Heinemeier, K. M. et al. (2016) Radiocarbon dating reveals minimal collagen turnover in both healthy and osteoarthritic human cartilage. *Sci. Transl. Med.* **8**, 346ra390 (2016).
- Malda, J. Groll, J., van Weeren, P.R. (2019) Rethinking articular cartilage regeneration based on a 250-year-old statement. *Nature Rev. Rheum.*, 15:571-572. doi: 10.1038/s41584-019-0278-7.
- De Ruijter, M., Diloksumpan, P., Dokter, I., Brommer, H., Smit, I.H., Levato, R., van Weeren, P.R., Castilho, M., Malda, J. (2023) Orthotopic equine study confirms the pivotal importance of structural reinforcement over the pre-culture of cartilage implants. *Bioeng. & Translat. Med.*, 2023;e10614. <https://doi.org/10.1002/btm2.10614>

- Kunt u de nauwe samenwerking binnen uw faculteit benoemen, aangezien een andere onderzoeksgroep ook studies naar gewrichtsaandoeningen heeft?

Antwoord: De andere groep is die van [REDACTED]. Met deze groep wordt inderdaad nauw samengewerkt (bijvoorbeeld gezamenlijk inzet van analisten en postdocs) en gemeenschappelijke promovendi. Wel is het zo dat het focus van de groep [REDACTED] vooral ligt op lage rugpijn en tussenwervelschijfproblematiek (iets wat bij paarden veel minder speelt) en op de farmaceutische behandeling van gewrichtsaandoeningen door middel van geavanceerde medicatietechnieken zoals vertraagde afgifte op basis van gelen en micro-beads. Ook zijn zij betrokken bij het onderzoek naar de effecten van gewrichtsdistractie. De chirurgische behandeling door middel van door bio-fabricage geproduceerde osteochondrale scaffolds vindt alleen in het paardenmodel plaats.

Ter verduidelijking op vraag 1 en 2 hebben we tekst toegevoegd aan de "Background" sectie.

- U benoemt werkpaarden. In Nederland zijn geen klassieke werkpaarden. Wilt u dit niet of op een andere manier benoemen?

Antwoord: We begrijpen het punt met betrekking tot "werkpaarden" en zullen deze term herzien en aanpassen om verwarring te voorkomen.

- Zoals het nu beschreven is lijkt het erop dat er een defect wordt gerepareerd i.p.v. dat er sprake is van regeneratie. De studie is echter preventief en curatief. Kunt u dit duidelijker omschrijven? De DEC interpreteert het doel als dat kraakbeenregeneratie nog niet helemaal mogelijk is en dat u daarom met deze aanvraag nu gaat voor een hybride benadering waarbij zowel een defectreparatie alsmede ondersteunende therapievormen zoals remming van inflammatie en kraakbeendegeneratie wordt gecombineerd. Indien dit juist is, wilt u dit in de inleiding en ook in de NTS verduidelijken?

Antwoord: De therapieën die we testen zijn erop gericht om uiteindelijk het kraakbeen te herstellen. Volledig kraakbeenherstel is op dit moment echter niet mogelijk daarom wordt er gekeken naar een gecombineerde benadering waarbij zowel beschadigingen worden opgevuld/vervangen alsmede ondersteunend met therapievormen die bepaalde aspecten van gewrichtsziekten beïnvloeden. Met ondersteunende therapievormen behandelen we aspecten van gewrichtsziekte zoals de remming van inflammatie of het stimuleren van het aanmaken van de bouwstenen van kraakbeen.

Ter verduidelijking hebben we de volgende tekst toegevoegd aan "Objectives of the project" van de NTS sectie.

- In het gesprek gaf u aan (vooral) pony's als proefdieren te gaan gebruiken terwijl u in het project paarden vermeld. Volgens de DEC komen gewrichtsaandoeningen bij pony's veel minder voor dan bij paarden. Kunt u overal het juiste proefdier in het project (en de bijlagen) vermelden? Kunt u tevens kort onderbouwen waarom een pony een goed diertype voor (het doeldier) paard en uiteindelijk voor de mens is? Kunt u tevens onderbouwen of dit model gevalideerd is?

Antwoord: Het gebruik van pony's als proefdieren is gebaseerd op de praktische haalbaarheid van het gebruik van deze dieren in het onderzoek. We zullen dit verder onderbouwen en aangeven waarom pony's als model relevant zijn voor paarden en uiteindelijk voor mensen. We zullen ook verduidelijken of het model is gevalideerd. Een verduidelijking is toegevoegd aan de "3.1 Background" sectie.

Doel.

Haalbaarheid:

- U benoemt 'multiple pipelines' voor deze onderzoeksvraag. Kunt u dit uitgebreider omschrijven en eventuele (verwachte) commerciële partners benoemen?
- Om een inschatting te maken over de haalbaarheid van het project is het voor de DEC belangrijk om de financieringsstromen inzichtelijk te hebben. U heeft tijdens het gesprek met de DEC aangegeven niet alleen de 1e geldstroom in te kunnen zetten maar ook externe gelden. Kunt u vermelden (in algemene termen) hoe u in de huidige aanvraag hiermee om bent gegaan en wat de verwachting is voor deze nieuwe aanvraag?

Antwoord: We zullen de "multiple pipelines" en eventuele commerciële partners uitgebreider beschrijven en toelichten in de aanvraag. Een verduidelijking is toegevoegd aan de "3.2.2 project's feasibility" sectie.

Belang.

- Kunt u tevens bij Stakeholders toevoegen wat het belang (incl. ongunstig effect) van de experimenten voor de proefdieren en de verwachte patiëntenpopulaties (paarden en mensen) is?
- De tekst zoals beschreven bij de belanghebbende 'experimental horses' hoort hier volgens de DEC niet en zou weggelaten kunnen worden omdat dit ook in de bijlage beschreven wordt. Wilt u dit zo nodig verwijderen?

Antwoord: We zullen Stakeholders toevoegen wat het belang en eventuele ongunstige effecten van de experimenten zijn voor zowel de proefdieren als de verwachte patiëntenpopulaties (paarden en mensen). We zullen het punt met betrekking tot 'experimental horses' verwijderen omdat dit elders in de bijlagen wordt beschreven. Een verduidelijking is toegevoegd aan de " 3.3.2 stakeholders" sectie.

Strategie.

- De DEC vindt de flow-chart helder maar zou graag een toelichting/ voorbeelden willen zien in welke stap(pen) het onderzoek (of de verschillende te testen interventies bij een hybride aanpak) zich nu bevindt/bevinden aangezien de aanvraag heel breed is. Kunt u dit aangeven?

Antwoord: We zullen toelichtingen en voorbeelden toevoegen om aan te geven in welke specifieke stappen het onderzoek zich bevindt, vooral gezien de brede reikwijdte van het onderzoek. Een verduidelijking in de vorm van een concreet voorbeeld is toegevoegd aan de "3.4 Strategie" sectie .

Bijlage

B) De dieren

- Kunt u in bijlage 2 de gender van het dier in de tabel (voetnoot of elders in de tekst) kort aangeven wat 'no preference' betekent, i.e. dat er om dit onderzoek geen verschil te verwachten is tussen mannelijk en vrouwelijke dieren (wel in gedachten houdend dat er in de prevalentie van osteoarthritis in het kniegewricht bij mensen wel een significant verschil tussen mannen en vrouwen is).

Antwoord: We zullen in bijlage 2 de gender van de dieren verduidelijken en aangeven wat 'no preference' betekent. De volgende verduidelijking is toegevoegd aan bijlage 2:

There are, unlike the situation in humans where knee OA is more prevalent in women than in men, to the knowledge of the authors, no data about nor indications of sex differences in horses with respect to either the incidence of OA or tissue characteristics of articular cartilage. There is, to the knowledge of the authors, also no anecdotal clinical evidence pointing in this direction.

D) Pijn en welzijnsaantasting.

- Kunt u in bijlage 2 het juiste hokje aankruisen (ontbreekt nu) waar u de toelichting voor de pijnbestrijding heeft vermeld?

Antwoord: We zullen het juiste hokje aankruisen voor de toelichting over pijnbestrijding in bijlage 2.

F) Classificatie ongerief

- U heeft op basis van uw ruime ervaring met deze (test)operaties aangegeven dat complicaties zelden voorkomen en dat de vermelde 2% eigenlijk minder dan 1% zal zijn in de praktijk. In bijlage 2 geeft u aan dat sommige paarden niet goed uit de narcose komen.

Of bedoelt u dat de paarden niet snel genoeg herstellen na de ingreep? Wilt u dit duidelijker omschrijven?

Antwoord: We zullen de formulering over complicaties en herstel in bijlage 2 duidelijker maken. De volgende verduidelijking is toegevoegd aan bijlage 2:

- *Based on our experience the horses we use for the osteochondral model do not run a greater risk of serious postoperative complications than any other sound horse that is put under general anesthesia for an elective intervention (* < 1%). Typically, these horses will be on their feet approximately 30 minutes after being transferred to the recovery box. Any-how, the animals will be routinely clinically monitored during recovery. Might it nonetheless occur that the HEP will be reached, we will immediately treat to prevent further suffering.*

Niet Technische Samenvatting.

- Wilt u de juiste aantallen vermelden bij het ongerief (alle 40 dieren ondervinden matig ongerief)? En volgens de DEC is er geen sprake van non-recovery. Wilt u dit nagaan en waar nodig corrigeren?

Antwoord: We zullen zorgen voor een nauwkeurige beschrijving van de procedures en de effecten op de dieren in deze samenvatting de aantallen vermelden in de tekst zodat gevolgd kan worden welke dieren matig ongerief hebben maar ondanks dit toch gedood worden.

Als klinische waarnemingen (denk aan zwelling, huidtemperatuur, drukgevoeligheid) voldoende zijn en als er geen ernstige effecten optreden ten gevolge van het experiment worden de paarden na een herstelperiode hergebruikt (30 paarden/ponies). Mochten we geïnteresseerd zijn in de omliggende weefsels dan kunnen de paarden in parallel gebruikt worden voor chirurgisch onderwijs. Na implantatie worden dan operatietechnieken geoefend en zal het dier gedood worden (10 paarden/ponies).

De paarden die gebruikt worden voor het kraakbeen-/botdefectexperiment zullen aan het einde van het experiment gedood worden zodat we een grondig onderzoek kunnen doen naar het betrokken weefsel (90 paarden/ponies).

- 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 onderzoek is gericht op gewrichtsaandoeningen bij paarden, specifiek het kniegewricht, omdat er geen adequate behandeling zoals een kunstgewricht beschikbaar is voor paarden. Deze aanvraag sluit aan op de eerder vergunde aanvraag AVD1080020186885 waarbij het gaat om langlopend en valide onderzoek. Het doel is een meer duurzame behandelingsstrategie te ontwikkelen voor de behandeling van (knie)gewrichtsaandoeningen bij paarden en deze aandoening uiteindelijk te beheersen en herstellen, en waar mogelijk ook een vertaalslag te maken naar vergelijkbare gewrichtsaandoeningen bij de mens.

Tot op heden is er nog geen duurzame oplossing voor beschadigd gewrichtskraakbeen en onderliggend bot en leidt dit tot ernstige gewrichtsaandoeningen, pijn en blijvende invaliditeit bij paarden en vaak tot vroegtijdige euthanasie. Met deze aanvraag willen de onderzoekers een meer hybride benadering: defectreparatie gecombineerd met ondersteunende therapievormen. Hiervoor is het nodig om bij pony's en paarden, als model voor paarden, sommige eerder uitgevoerde experimenten te herhalen en andere experimenten nieuw op te zetten om ook de lange-termijn effecten te bestuderen. Om deze studies veilig te kunnen uitvoeren, moeten voor sommige biomaterialen vooronderzoeken worden gedaan (weefsel-compatibiliteit) terwijl voor medicijnen deze eerste stappen (veiligheidsonderzoek) reeds gedaan zijn. Daarnaast moeten biomaterialen en implantaten langdurig getest worden na plaatsing in het gewricht, zoals de beoordeling implantaat / scaffold naar 12-24 maanden, om de therapeutische waarde te kunnen bepalen.

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(en).

Belangen en waarden

4. Kraakbeenregeneratie is bij paarden (en mensen) tot op heden nog niet volledig mogelijk. Het directe doel van het project is daarom een hybride benadering waarbij zowel een defectreparatie als ondersteunende therapievormen zoals remming van inflammatie en (progressieve) kraakbeendegeneratie worden gecombineerd. Het uiteindelijke doel van het project is de behandeling van (knie)gewrichtsaandoeningen bij paarden duurzaam te bevorderen. 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 orthopedische onderzoeksveld en de behoeften vanuit de veterinaire en humane geneeskunde.

De DEC heeft gediscussieerd over de ethiek t.a.v. onderzoek met dierproeven voor met name sportpaarden. Als het zo is dat sportpaarden eerst overbelast worden en daarna weer worden 'opgelapt', dan is de vraag of het niet beter is om de overbelasting aan te pakken cruciaal. Als een sportpaard meer rust of betere trainingsmethoden zou krijgen dan kan de overbelasting voorkomen worden. Zo zijn bij private en manegerijpaarden gewrichtsaandoeningen zeldzamer en manifesteren die zich pas op late leeftijd. In het gesprek hebben de onderzoekers de DEC voldoende overtuigd dat het onderzoek voor *alle* paarden een belangrijke klinische doelstelling is, om pijn en ongerief te verminderen en waar mogelijk te voorkomen,

5. De voornaamste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren (pony's en paarden), de toekomstige paard-patiënten (doeldieren) en humane patiënten met osteochondraal letsel of (knie)gewrichtsaandoeningen, de samenwerkingspartners en de onderzoekers. De proefdieren hebben er veel belang bij gevrijwaard te blijven van de experimenten en de vroegtijdige dood. De toekomstige patiënten met de veelvoorkomende (knie)gewrichtsaandoeningen hebben juist groot belang bij dit onderzoek doordat er mogelijk een therapie of device ontwikkeld kan worden om hun pijnlijke klachten blijvend te verhelpen en daardoor de kwaliteit van hun leven te verhogen. De samenwerkingspartners hebben commerciële belangen indien de devices voor de klinische praktijk ingezet gaan worden. Voor de onderzoekers is het van groot belang om voor al hun inzet voor dit langlopende onderzoek aansprekende onderzoeksresultaten voor deze wereldwijde problematiek te behalen.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de ervaren onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij dit langlopende onderzoek en de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd (onder andere blijkend uit eerder behaalde resultaten op dit specifiek onderzoeksterrein) 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 uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Voor dit onderzoek is het nodig om sommige, eerder uitgevoerde, experimenten deels te herhalen terwijl andere proeven juist nieuw ingezet worden. Dit is volgens de DEC een begrijpelijke benadering en voldoende toegelicht in het vermelde stappenplan. Verder leek in eerste instantie het gezonde oude paard (waar letsel aan toe gebracht wordt) het proefdier te zijn maar in het onderzoeksplan worden paarden én pony's genoemd. Het paard is echter doeldier. Daarbij hoorde volgens de DEC ook een verhandeling over de vraag of een pony een valide model voor (sport-)paarden is. De onderzoekers hebben dit voldoende toegelicht en o.a. aangegeven dat pony's beter te

beheersen zijn en een minder ingrijpende kijkoperatie nodig hebben dan paarden (waar een incisie voor nodig zou zijn). 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:
- 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)
10. De dieren worden waar mogelijk (op grond van overwegingen die te maken hebben met hun welzijn) gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Dieren staan in grote individuele boxen waarbij contact met andere dieren mogelijk is en krijgen regelmatig beweging. De DEC heeft er begrip voor dat de dieren voor bloedafname, subcutane implantatie en in de periode rondom de operatie individueel moeten worden gehuisvest. Na de hersteltijd van de operatie worden de dieren wel in groepsverband gehuisvest.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is met licht (bijlage 1) en matig (bijlage 2) ongerief realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor de veiligheidsstudie (bijlage 1) worden 40 dieren van de vergunninghouder gebruikt. Hiervan worden onder lokale verdoving bij 10 dieren een subcutane implantatiestudie uitgevoerd en bij 30 dieren bloed afgenomen waardoor licht ongerief ontstaat. Deze voorbereidende studies (veiligheidsonderzoek) *in vitro* en *in vivo* zijn nodig om ongewenste reactie op de biomaterialen, die geïmplantemd zullen worden, te kunnen voorspellen (en uit te sluiten).

Uiteindelijk wordt bij 90 commercieel verkregen gezonde proefdieren focaal zodanig (osteo)chondraal letsel toegebracht dat het kraakbeen en het bot rondom de schade nog in gezonde staat blijft (bijlage 2). De DEC onderkent de meerwaarde van deze opzet waarbij gezonde dieren van deze leeftijd worden gebruikt, omdat hierdoor het effect op het omringende weefsel onderzocht kan worden. Deze operaties voor het kraakbeen- en botdefectexperiment vinden plaats onder algehele narcose en veroorzaken bij alle 90 dieren matig ongerief. Uit eerdere ervaringen van de onderzoekers blijkt dat er een zeer geringe kans op complicaties is. De dieren krijgen waar nodig pre- en postoperatief pijnstilling toegediend en

ondergaan (minimaal) invasieve controles zoals radiologisch onderzoek, bewegingsanalyse of bloedafname, afhankelijk van het experiment. De dieren worden na 12-24 maanden gedood voor patho-histologisch onderzoek van de laesies en het herstelproces.

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door de anesthesie, het aangebrachte letsel aan de gewrichten van gezonde dieren, de bloedafname of de subcutane implantatie en de vroegtijdige dood of hergebruik.
13. Voor zowel de experimenten in bijlage 1 (bloedafname en subcutane implantatie) als in bijlage 2 (operatie) worden geen humane eindpunten verwacht. De gezondheid van de dieren wordt continue gemonitord waarbij o.a. gelet wordt op infecties, septische artritis, reacties op het geïmplanteerde materiaal en bijwerkingen van de geneesmiddelen. De ruime ervaring van de onderzoekers met de operatie voor het kraakbeen- en botdefectexperiment is dat er zelden complicaties voorkomen (<1%). Na de operatie worden heldere kreupelheidsscores gehanteerd om ongerief te voorkomen en het dier te kunnen euthanaseren indien zich ernstige complicaties voordoen. In de afgelopen jaren is dit echter nog niet voorgekomen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het is voor de studie cruciaal om te weten hoe een levend dier na de operatie reageert op de behandeling van het kraakbeen- en botdefect in verband met het beoordelen van de belastbaarheid en duurzaamheid.
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. Voor de experimenten in bijlage 1 worden voornamelijk dieren gebruikt die voor onderwijsdoeleinden ingezet worden.
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. Indien mogelijk worden de dieren buiten gehuisvest.
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 ingezet worden, afhankelijk van het aanbod, aangezien er voor paarden geen relatie tussen gewrichtsaandoeningen en sekse aangetoond is.

19. De meeste dieren worden in het kader van het project in verband met postmortem histologisch onderzoek gedood voor o.a. de beoordeling van de geïmplanteerde scaffolds en analyse van de omliggende weefsels. Het betreft 30 dieren met de subcutane implantatie met cellulaire infiltratie parameter (bijlage 1) en alle 90 dieren na de operatie (bijlage 2). De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, d.m.v. een overdosis van het barbituraat euthesaat gedood.
20. Een deel van de dieren uit bijlage 1 wordt hergebruikt: 10 dieren met de subcutane implantatie met extern zichtbare weefselreactie en 30 dieren i.v.m. de bloedafname. Deze dieren blijven na het experiment leven en worden voor verdere onderwijs- en onderzoeksdoeleinden ingezet waarbij gelet wordt op het aantal handelingen per dier.

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 inzicht in de mechanismen en het ontwikkelen van een duurzame behandeling van (knie)gewrichtsaandoeningen bij paarden en deze aandoening uiteindelijk te herstellen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief (40 dieren bijlage 1) en matig ongerief (90 dieren bijlage 2). Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er aan bijdragen dat voor paarden (de doeldieren), genezing van veel voorkomende en pijnlijke gewrichtsaandoeningen mogelijk wordt. Het is aannemelijk dat deze doelstelling op termijn behaald zal worden en dat het onderzoek tevens waardevolle informatie voor de humane geneeskunde oplevert (translationele doelstelling). 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 het verbeteren van de behandelstrategie bij een osteochondraal defect bij paarden een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke 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 gekozen 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 een tussenrapportage na twee jaar, waarin wordt aangegeven wat de bevindingen tot dan toe zijn en waarom die voortzetting van het onderzoek rechtvaardigen, in verband met het langlopende onderzoek.
- 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 consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 80125

3508 TC UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317438

Bijlagen

2

Datum 29 september 2023

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 29 september 2023. Het gaat om uw project "(Osteo)chondral defect repair in horses". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202317438. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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.

Datum:

29 september 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317438

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800

Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

Straat en huisnummer: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50

Postbus: 80125

Postcode en plaats: 3508TC UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling: Clinical Sciences

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling: Clinical Sciences

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam:

Functie:

Afdeling: Clinical Sciences

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 februari 2024
Geplande einddatum: 31 januari 2029
Titel project: (Osteo)chondral defect repair in horses
Titel niet-technische samenvatting: Treatment of damaged cartilage and bone in horses
Naam DEC: DEC Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.845,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 25 september 2023



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU -ASC



Postbus 80.011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317438

Bijlagen

2

Datum 29 september 2023

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 29 september 2023

Vervaldatum: 29 oktober 2023

Factuurnummer: 2317438

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving | Bedrag |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202317438 | € 1.845,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven te 's Gravenhage.

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#); [UBD.FCA.ASC.Factuur](#); [CvB_postmap \(UBD BS\)](#)
Cc: [REDACTED] DEC-Utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD10800202317438
Date: vrijdag 1 december 2023 12:35:15

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.

Geachte [REDACTED]

Op 29-09-2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "(Osteo)chondral defect repair in horses" met aanvraagnummer AVD10800202317438. 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

- Uw NTS bevat verwijzingen naar andere onderzoeksgroepen, instituties en onderzoekers. Kunt u de NTS anonimiseren?

- U spreekt in de NTS bij het geplande lot over 'onder een andere DEC vallend' chirurgisch onderwijs. Bedoelt u hiermee een andere aanvraag waar de CCD een vergunning voor heeft verleend?

- U spreekt in de NTS over het euthanaseren van de dieren. De CCD vindt dat het woord doden een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u euthanaseren aanpassen in doden?

- U spreekt in de NTS over 100 dieren die terminaal ongerief ondervinden. In uw aanvraag zijn deze dieren niet benoemd. Kunt u de aantallen en het ongerief in de NTS consistent maken met de aanvraag?

- Kunt u de NTS in het daarvoor bestemde Excel format indienen?

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.

Mochten uw antwoorden voor vrijdag 8 december a.s. door ons ontvangen zijn, kunnen deze worden meegenomen tijdens de inhoudelijke bespreking van uw dossier in de vergadering van de CCD.

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.



Utrecht University

**Faculty of Veterinary Medicine
Department Clinical Sciences**

Visiting address: Yalelaan 108, 3584CM Utrecht

Our reference: [REDACTED]

Subject: CCD aanvraag AVD10800202317438

E-mail: [REDACTED]

Telephone [REDACTED]

Date: 7 December 2023

Geachte [REDACTED]

In antwoord op uw email dd 1 december jl. heb ik het genoegen u de NTS van CCD aanvraag AVD10800202317438 in het juiste format te doen toekomen en op uw vragen te antwoorden:

- Uw NTS bevat verwijzingen naar andere onderzoeksgroepen, instituties en onderzoekers. Kunt u de NTS anonimiseren? *In de nieuwe versie van de NTS zijn geen verwijzingen opgenomen die op enigerlei wijze herleidbaar zijn tot instellingen, onderzoeksgroepen of personen.*

- U spreekt in de NTS bij het geplande lot over 'onder een andere DEC vallend' chirurgisch onderwijs. Bedoelt u hiermee een andere aanvraag waar de CCD een vergunning voor heeft verleend? *Deze formulering komt in de nieuwe NTS niet voor.*

- U spreekt in de NTS over het euthanaseren van de dieren. De CCD vindt dat het woord doden een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u euthanaseren aanpassen in doden? *Op die plaatsen waar het woord "euthanasie" gebruikt werd is dat vervangen door een formuleringen met "dood" of "doden".*

- U spreekt in de NTS over 100 dieren die terminaal ongerief ondervinden. In uw aanvraag zijn deze dieren niet benoemd. Kunt u de aantallen en het ongerief in de NTS consistent maken met de aanvraag? *De aantallen zijn aangepast en nu consistent met de aanvraag.*

- Kunt u de NTS in het daarvoor bestemde Excel format indienen? *Bijgeleverd*

Ik hoop u op deze wijze van voldoende informatie voorzien te hebben.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 80125

3508 TC UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317438

Bijlagen

3

Datum 20 december 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 29 september 2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "(Osteo)chondral defect repair in horses" met aanvraagnummer AVD10800202317438. 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 uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 februari 2024 tot en met 31 januari 2029.

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 24 november 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 1 december 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de Niet Technische Samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

20 december 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317438

Overwegingen

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. De DEC heeft de CCD geadviseerd een tussenrapportage na twee jaar als voorwaarde te stellen voor de vergunning. De CCD neemt deze voorwaarde niet over omdat zij hiervoor geen juridische basis ziet.

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.

Datum:

20 december 2023

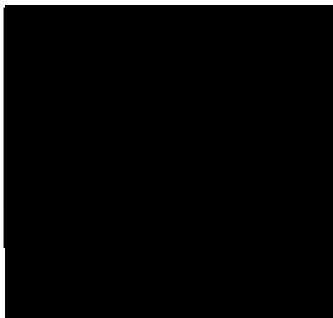
Aanvraagnummer:

AVD10800202317438

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

i.o.



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: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 80125

Postcode en plaats: 3508TC UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2024 tot en met 31 januari 2029, voor het project "(Osteo)chondral defect repair in horses" met aanvraagnummer AVD10800202317438, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Afdelingshoofd. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is ██████████ in paardenchirurgie en -orthopedie verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 29 september 2023
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 23 november 2023;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Safety studies, zoals ontvangen op 23 november 2023;
 - 3.4.3.2 (Osteo)chondral defect model, zoals ontvangen op 23 november 2023;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 18 december 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 24 november 2023
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 18 december 2023.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ongerief |
|---|--|---------------|--------------|
| 3.4.3.1 Safety studies | | | |
| | Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae) | 40 | 100,0% Licht |
| 3.4.3.2 (Osteo)chondral defect model | | | |
| | Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae) | 90 | 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

Aanvraagnummer: AVD10800202317438

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:

AVD10800202317438

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

Aanvraagnummer:
AVD10800202317438

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.

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 blijvende 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.