

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202114471	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 2-2-2021				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x				x	
4	NTS bij de aanvraag			x						
5	E-mail aan DEC om advies aanvraag projectvergunning, d.d. 10-02-2021				x				x	
6	DEC-advies, d.d. 7-5-2021				x				x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
8	Bijlage dierproeven na DEC advies				x				x	
9	NTS a DEC advies			x						
10	AdviesnotaCCD, d.d. 17-5-2021 _met opmerkingen				x		x		x	x
11	AdviesnotaCCD, d.d. 31-05-2021				x		x		x	x
12	NTS na CCD vragen en definitieve versie			x						
13	AdviesnotaCCD, d.d. 31-05-2021				x		x		x	x
14	Beschikking, d.d. 31-05-2021				x		x		x	
15	E-mail CCD aan DEC over aanvraag projectvergunning, d.d. 15-06-2021.				x		x		x	



## 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](http://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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	5.1 lid2h
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> 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	5.1 lid2h
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel 5.1 lid2e
		E-mailadres contactpersoon	contact via 5.1 lid2e
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel 5.1 lid2e
		E-mailadres gemachtigde	5.1 lid2e
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	5.1 lid2h
		Postcode en plaats	
		Postbus, postcode en plaats	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e
		Functie	5.1 lid2e
		Afdeling	5.1 lid2h

	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	5.1 lid2e
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	5.1 lid2e
	Afdeling	5.1 lid2h
	Telefoonnummer	n.v.t.
	E-mailadres	5.1 lid2e
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 5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
	Functie	5.1 lid2e
	Afdeling	5.1 lid2h
	Telefoonnummer	n.v.t.
	E-mailadres	5.1 lid2e
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer
	E-mailadres	contact via 5.1 lid2e
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input type="checkbox"/> Nee

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een wijziging 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 melding op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" 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 01-04-2021 Einddatum (t/m) 31-03-2025
3.2	Wat is de titel van het project?	Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het effect van rekken op gewrichts- en spiereigenschappen bij een dwangstand van een gewricht
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC 5.1 lid2h Postadres 5.1 lid2h

E-mailadres

5.1 lid2e

## 4 Factuurgegevens

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

Naam:	Afdeling:	
Straat:	Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail: 5.1 lid2h en in cc 5.1 lid2e		

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

Ordernummer:	
Inkoopordernummer: 5.1 lid2h	
Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en te versturen naar het factuur mailadres.	

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 1
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
Overige bijlagen, indien van toepassing	
<input checked="" 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 5.1 lid2e

Functie 5.1 lid2e

Plaats 5.1 lid2h

Datum 02 - 02 - 2021

Handtekening

5.1 lid2e



## 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 our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Contractures are joint dysfunctions that are clinically characterized by a forced joint position, decreased joint range of motion, and increased joint stiffness (Katalinic et al, 2017, *J Physiother*; Nuckolls et al, 2020, *Muscle Nerve*). Contractures can cause cosmetic impairments, and functional impairments leading to a significant burden on patients due to decreased independence in activities of daily living. In more severe cases, a contracture can for instance result in losing the ability perform certain abilities of daily living such as the ability to dress independently or walk. Community participation can be reduced causing social isolation and a decreased quality of life (Nuckolls et al, 2020, *Muscle Nerve*).

Contractures affect many people in all age groups (from young children to older adults) suffering from a large variety of neurological and musculoskeletal disorders. Neurological disorders and muscle diseases causing contractures include spastic cerebral palsy, stroke, traumatic brain injury, spinal cord injury, spina bifida, Duchenne muscular dystrophy and Charcot-Marie-Tooth disease (Harvey et al, 2017, *J Physiother*). Contractures also often develop in response to musculoskeletal and skin conditions and complications such as osteoarthritis ankylosing spondylitis, Dupuytren, submucous fibrosis, total joint replacement, adhesive capsulitis, burns, scarification, immobilization, fracture, amputation and systemic sclerosis (Harvey et al, 2017, *J Physiother*). The total prevalence of contractures is not exactly known. The prevalence differs between the aforementioned disorders (from 15-80%), indicating that a large number of patients is affected. In burns victims, for example, the contracture prevalence at discharge is 38-54% (Oosterwijk et al, 2017, *Burns*). In spinal cord injury, major contractures occur in 15-30% of patients (Fergusson et al, 2007, *Clin Orthop Relat Res*). In a long term care facility for the elderly, 31% and 26% of the residents had upper extremity and lower extremity contractures respectively (Fergusson et al, 2007, *Clin Orthop Relat Res*). In Dutch nursing homes, 58% patients with central nervous system disorders have contractures (Meijer et al, 2017, *Disabil Rehabil*).

We published that contractures are caused by shortening of tissues spanning the joints, most notable muscles. This has significant functional consequences for the muscle and joint, such as limited shortening capacity, a shift in the joint angle-torque relationship (Kalkman et al, 2020, *Front Physiol*), and deficits in proprioception (i.e. sense of body position mediated by mechanosensors within muscles and joints) (Mahmud et al, 2017, *Clin Genet*). A commonly used treatment for contractures, aimed at increasing the joint range of motion and reducing joint stiffness, is **stretching**. Stretching acutely lengthens the muscle-tendon units spanning the joint. However, it is unknown how this stretch is distributed among muscle belly (i.e. muscle fibers) and tendon. For optimal effects on physical functioning, the muscle fibers should primarily be stretched (Kalkman et al, 2020, *Front Physiol*). Even though stretch treatments are often applied, there is no clear agreement about which type (e.g. static, dynamic) or dosage (frequency, duration, magnitude) results in the best long-term outcome of the treatment. Previous studies did usually not specify the magnitude of the stretch applied, or based it on the participants' perception and tolerance (Freitas et al, 2018, *Scand J Med Sci Sports*). Also the frequency and duration were highly variable among studies (*for review see* Katalinic et al, 2017, *J Physiother*). The modality (i.e. equipment used for imposing stretch) and corresponding type of stretch treatment used are often based on the equipment available in the clinic and/or the preference of the attending physician, instead of on what would lead to the most beneficial outcome regarding joint range of motion, as well as adaptations in muscle and tendon. **Two types of stretch treatment are frequently applied: (1) a static stretch in which constant strain is applied with an initially high load, whereafter the joint is held in this (usually end-range) position manually (i.e. by a physician), or with an orthosis or plaster cast, (2) a dynamic stretch with a constant torque around the joint applied manually or by an orthosis (Bhave et al, 2019, *Ann Transl Med.*; Farmer & James, 2001, *Disabil Rehabil*; Hösl et al, 2015, *J Child Orthop*).** The biomechanical conditions of the joint and muscle-tendon unit are different between these two types of treatment (Duenwald et al, 2009, *Ann biomed Eng*; Fung, 1967, *Am J Physiol*; Konrad et al, 2017, *Eur J Appl Physiol*; Magnusson et al, 1996, *Scand J Med Sci Sports*; Ryan et al, 2010, *Eur J Appl Physiol*; Taylor et al, 1990, *Am J Sports Med*). In static stretch, with the joint kept at a fixed angle (constant strain), the stress in the stretched structures decreases over time (a phenomenon called viscoelastic stress relaxation). During dynamic stretch, by application of a constant

torque around a joint, the stress remains constant and the strain in the structures increases over time (a phenomenon called viscoelastic creep).

Multiple studies in human subjects have shown that static stretch treatments have a positive effect on joint range of motion and on gait parameters (for review see Craig et al, 2016, *Pediatr Phys Ther*). However, there is also evidence indicating that dynamic stretching is more effective than static stretching (Light et al, 1984, *Phys Ther*; Yeh et al, 2007, *J Electromyogr Kinesiol*). It is unclear how muscle and tendon tissues respond to the different treatments. To further optimize stretch treatment in patients, more detailed knowledge about the effects of stretch interventions on the mechanical and morphological properties of skeletal muscle is needed.

Animal studies have shown that muscles undergo structural adaptations when exposed to stretch treatments. It has been found that sarcomeres (i.e. contractile elements of muscle fibers) are added at the end of muscle fibres after several weeks of stretch (De Jaeger et al., 1985, *J Appl Physiol*; Williams & Goldspink, 1973, *J Anat*) and that 30 minutes of stretch a day can prevent the loss of sarcomeres in series within muscle fibers during three weeks of immobilization (Williams, 1990, *Ann Rheum Dis*). It has also been shown that continuous stretch of the muscle-tendon unit due to a tendon transfer causes sarcomeres to be added in series followed by tendon lengthening (Takahashi et al., 2010, *J Bone Joint Surg Am*). The effects of stretch treatment on physical functioning do not depend only on changes in muscle structure, but also on changes in the mechanical and sensory muscle properties. However, the effects of stretch treatment on these muscle properties are still poorly understood. For a full understanding of stretch treatment, integrated studies including both muscle structure and function are required.

We choose to perform this research in the ankle joint and the plantar flexor muscles of the rat. The ankle joint, because of the frequent occurrence of ankle contractures. The rat model is selected, because of the anatomical and morphological similarities of these structures. In addition, there is ample knowledge about this musculoskeletal system of this model, in our laboratory we have the required equipment and technical assistance to perform the mechanical, morphological and sensory measurements of skeletal muscle.

This project is part of a larger research effort to optimize the treatment strategies for people with joint contractures. Our results will be used in a clinical study where plantar-flexors of children with cerebral palsy will be stretched, as well as for recommendations regarding the most beneficial type of stretch treatment in other patient groups.

---

### **3.2 Purpose**

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

---

### **Objectives**

This project will provide more insight in mechanical, morphological and sensory adaptations of muscle-tendon units to long-term dynamic stretch (constant stress) treatment or long-term static stretch (constant strain) treatment in the presence of a joint contracture.

*The project consists of one study with a general aim and three sub-aims.* The general aim of this preclinical study is to reveal how muscle and tendon tissues adapt to different stretch treatments after induction of a contracture. The three sub-aims are as follows, 1) to investigate the effects of different stretch treatments on joint mechanical properties, 2) to assess how the mechanical and morphological

properties of muscle and tendon adapt to different stretch treatments, and 3) to assess the effects of stretch treatment on changes in muscle sensory feedback.

### **Achievability**

Our research group has ample experience with experiments similar to those proposed and all the necessary tools and equipment are available in our laboratory since former research has focussed on ankle and plantar flexor mechanics and sensory feedback of rats. Multiple publications in renowned, international, peer-reviewed journals exemplify our experience in the assessment of ankle joint mechanics, mechanics and morphology of the plantar-flexor muscles as well as sensory feedback using the rat model, in both healthy and pathological conditions (e.g. spasticity, stroke, tendon transfer). Also, our approach for immobilization to obtain a joint contracture has been successfully applied in previous studies. In short, all experimental procedures and measurement techniques to be applied in the present project have been implemented successfully by us in the past.

The duration of the project will be 4 years. All experiments in this project will be performed by one PhD student, who has recently been hired and is funded for 4 years. This student will be trained and assisted by a lab technician and supervised by an associate professor, who both have ample experience in all methods described above.

---

### **3.3 Relevance**

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

#### **Scientific relevance**

The objectives have fundamental and translational scientific relevance. The fundamental scientific relevance is portrayed by enriching the knowledge of mechanical and sensory behaviour and adaptability of skeletal muscle in response to different stretch treatments in case of a joint contracture. The proposed animal model allows for a detailed study in which not only the joint level mechanics, but also the muscle mechanics, muscle morphological and sensory characteristics will be assessed. The translational scientific relevance is characterized by the application of the novel insights to future clinical studies. Specifically, the findings of the proposed animal study will be used to define the parameters of muscle stretch in clinical research on the efficacy of stretch treatment in people with a joint contracture.

#### **Social relevance**

The social relevance is characterized by the frequent application of stretch treatment to people with a joint contracture in the clinic. Currently, the dosage and type of the stretch treatment is determined subjectively, based on the tolerance of the patient, and the available material and/or preference of the attending physician. The better understanding of the effects of different types and dosages of stretch treatments, as obtained in the proposed study, will help for more objectively prescribing a specific treatment.

---

### **3.4 Research strategy**

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

The project consists of one main study, a randomized controlled trial, investigating the effects of two different stretch-treatments (static stretch and dynamic stretch, see 3.1) on male Wistar rats with a contracture of the ankle joint. **Our main hypothesis is that the effects on mechanical, morphological and sensory muscle properties of dynamic stretch treatment will be greater than those of static stretch treatment.** We expect to use maximally 195 rats to attain the above-mentioned research aims (3.2). This project requires the optimization of some experimental procedures that will subsequently be applied in the randomized controlled trial (Figure 1).



### Parameter optimization

Prior to the start of the main study, optimization of two experimental procedures is required: (i) to define the most effective duration of the joint immobilization for induction of the joint contracture, and (ii) to define the most appropriate magnitude of joint loading to apply stretch in the static (constant strain) and dynamic (constant stress) stretch treatment groups. The outcome parameter for (i) is the range of motion of the ankle joint, for (ii) we will assess the mechanical response of muscle and tendon tissue to various stretch types and magnitudes.

### Randomized controlled trial

Rats will be randomly divided in **3 groups: a static stretch treatment, dynamic stretch treatment and sham treatment group**. The animals will be exposed to the following procedures (Figure 1), in chronological order:

- Immobilization of the right ankle
- Stretch treatment (or sham)
- Terminal experiments
- Tissue extraction

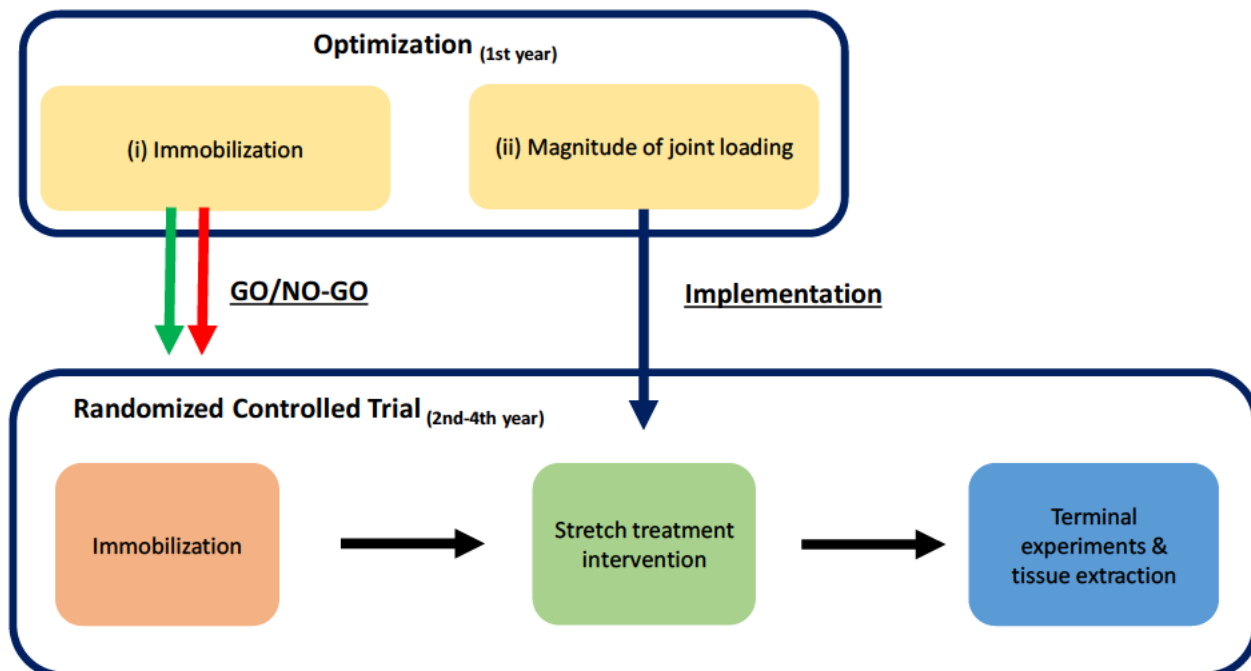


Figure 1: An overview of the overall design of the project.

### Overview of output variables

To attain our aims (3.2) and prove our main hypothesis we will measure the following variables:

1. *In-vivo joint mechanical properties*: ankle joint range of motion and the joint angle-torque relationship.
2. *In-situ muscle properties*.
  - a. *Mechanical properties*: length-force relationship, force-velocity relationship.
  - b. *Sensory properties*: the relationship between muscle length, muscle force and firing of muscle spindles and tendon organs.
3. *Ex-vivo morphological and structural properties*: muscle morphology (fiber length, number of sarcomeres in series, pennation angle) and muscle structure (connective tissue content, fiber type distribution).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The animals in the RCT will be exposed to the following procedures (Figure 1), in chronological order:

#### **Immobilization of the right ankle**

The right ankle will be immobilized with a subdermal non-absorbable suture through a ligament of the knee and tissue next to the calcaneus. The suture will be pulled taut to generate a plantar flexion-torque (the toes point downward) and after the immobilization the suture will be cut. For both the immobilization and release surgery the animal will be anaesthetized. With this internal **immobilization method**, the animal will not experience the discomfort and stress of an external fixation such as a plaster cast. The animals often gnaw on the material of the external fixation (Williams & Goldspink, 1973, *J Anat*), and when the animal gathers girth (Reynolds et al, 1996, *J Orthop Sports Phys Ther*) the fixation needs to be renewed weekly. This causes unnecessary stress for the animal and more frequent application of anaesthetics. In our lab, we have shown that a comparable approach can successfully limit the range of motion of the wrist of the rat.

#### **Stretch treatment**

The stretch treatment will occur on a daily basis, for maximum of 2 hours, after the immobilization is concluded. To perform the stretch treatment, the sedated rat will be placed on a custom-built device with its foot strapped in a tray that rotates around the ankle joint. With this device ankle angle and joint torque can be controlled. Based on the ankle torque at the end range of joint movement, the magnitude of each treatment will be selected. The intensity of the stretch can be compared to when a human brings his/her ankle to maximal dorsiflexion by leaning forward to stretch the calf muscles.

#### **Terminal experiments**

The animals will be deeply anesthetized. Ankle biomechanics (ankle joint range of motion and the angle-torque relationship) will be assessed with the same custom build device that will be used for the stretch treatment. The ankle will be brought into its end range of movement and the ankle angle and exerted torque will be measured while the rat is sedated. The severity of these measurements is classified as moderate, because the rats will be sedated and exposed to a painless measurement.

Subsequently, the passive and active mechanical properties of the plantar flexors will be assessed. The skin and the biceps femoris will be carefully removed without damaging nerves and blood vessels, to access the *triceps surae* (calf muscles). The plantar flexor muscles will be attached to a force transducer and servomotor. Under similar conditions as those described for assessment of mechanical muscle properties, firing of muscle sensors will be performed. Besides dissection of the muscles, also the lumbar dorsal roots containing the axons of the target muscle afferents will be exposed by laminectomy. **Muscle mechanical and sensory properties cannot be performed on the same animals**, because each assessment requires a full day of measurements.

#### **Tissue extraction**

After measurements of the mechanical properties, the plantar-flexor muscles and several antagonistic muscles of the treated and the contralateral leg will be excised, for analysis of morphological and structural characteristics of the muscle belly and tendon.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

This project requires the optimization of some experimental procedures that will subsequently be applied in the randomized controlled trial. The general outline of the study is portrayed in Figure 1.

#### **Parameter optimization**

Before we can start with the experiment to test the different stretch treatments we have to perform optimization experiments, which will take place in the first year of the study. These will consist of (i) experiments to **optimize the duration of the immobilization to induce a contracture**. Former

research including immobilization studies in our lab indicate that our approach can result in a contracture, however in the unlikely case that none of the tested immobilization durations result in a substantial contracture this will result in a no-go. The second optimization experiment will consist of (ii) measurements of muscle mechanical properties with an emphasis on viscoelastic properties of the muscle-tendon unit to **optimize the magnitude of the muscle stretch procedures** in both types of stretch treatment.

**Randomized Controlled Trial**

After optimization, the main study, a randomized controlled trial, will be performed in second to fourth year of the study. The therapeutic interventions in the randomized controlled trial consist of two different stretch treatments in rats with an induced joint contracture. Subsequently, terminal experiments will be performed in which the mechanical and sensory muscle properties will be assessed, and muscle and tendon tissues will be harvested for analysis of morphological and structural characteristics. See Figure 1 for a graphical overview of design of the project.

3.4.4 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	Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## 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, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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 overall objective is to reveal how muscle and tendon tissues adapt to different stretch treatments after induction of a joint contracture. With the experiments we can retrieve insight in the changes in joint and muscle-tendon unit mechanics, muscle morphology and sensory function when muscle-tendon units are stretched in the presence of a joint contracture. We will measure the following outcome parameters to address this objective:

1. *In vivo joint mechanical properties*: maximal joint range of motion and the passive ankle angle-torque relationship. These outcome parameters are affected by the stiffness of the structures spanning the ankle joint and, hence, will be used to assess the severity of the joint contracture (optimization study i) and the effects of the stretch treatment at the joint level.
2. *In-situ muscle properties*:
  - a. *mechanical properties*: length-force & force-velocity relationship. The muscles spanning the affected joint will be shortened and stiffened by the contracture. The goal of the stretch treatment is to bring back the muscles towards their normal length and stiffness (i.e. that before the joint contracture was induced). These parameters will characterize the effects of stretch treatment on the mechanical muscle properties.
  - b. *Sensory properties*: the relationship between muscle length, muscle force and firing of muscle spindles and tendon organs. Changes in muscle sensory function may be the

result of altered mechanical properties of muscle and/or tendon, but also of altered properties of the sensors. The goal of these measurements is to assess how the different stretching types affect sensory output, and if this is the result of changes in the muscle-tendon unit or muscle sensor.

3. *Ex-vivo morphological and structural characteristics: Morphology* (muscle, tendon & fiber length, number of sarcomeres in series, pennation angle) and structure (connective tissue content, fiber type distribution). Muscle morphology and structure are affected by joint contractures. The effects of stretch treatment on these outcome parameters will be assessed.

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

Prior to the randomized controlled trial (RCT), we will perform experiments to optimize the duration of the immobilization protocol (i) and the stretch treatment parameters (ii). A schematic of optimization experiment (i) is shown in Figure 1. For details about the procedures see specified tables. Twenty-one rats will be divided in **three groups of seven rats**. Each group will be exposed to a different immobilization duration. The immobilization durations will be varied from 4 to 6 weeks. The shortest duration with a significantly higher limitation in joint range of motion will be selected for the RCT. The exact age of the start of the stretch treatment (14, 15 or 16 weeks) and end of the stretch treatment (18, 19 or 20 weeks) will depend on the results of optimization (i).

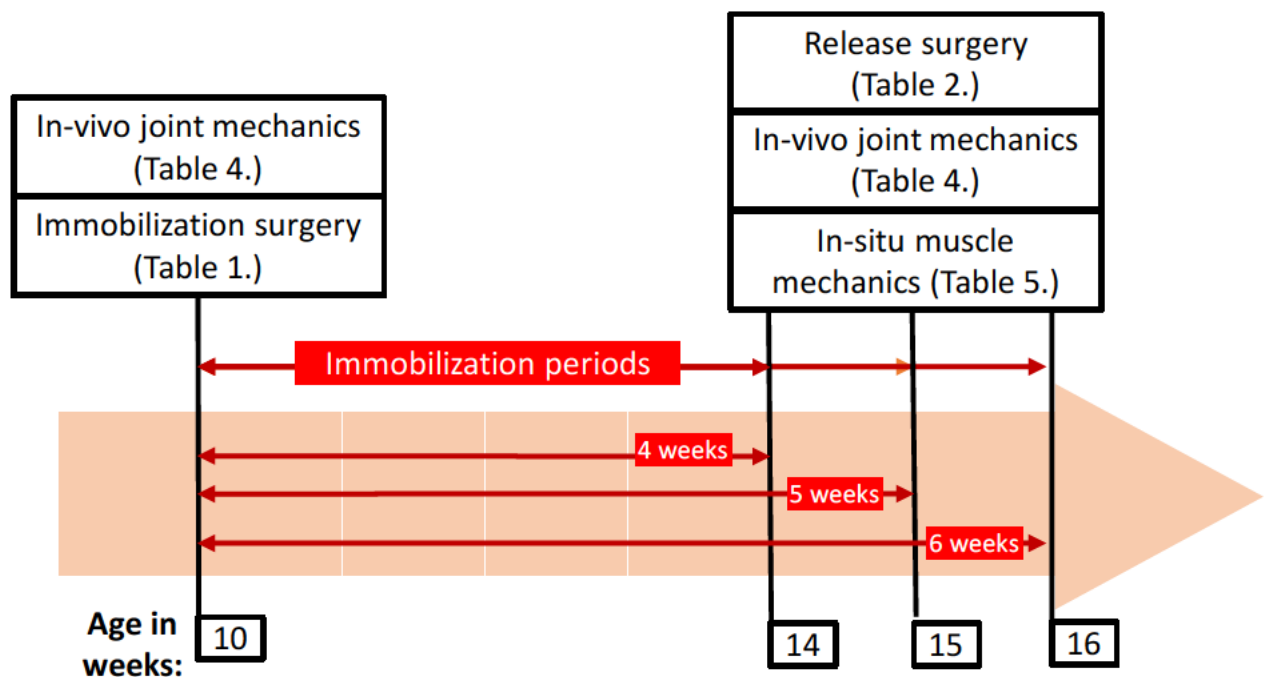


Figure 1. Optimization of duration of joint immobilization

The surgical procedures for (ii) are described in Table 5. Three different magnitudes of static and dynamic muscle stretch will be tested during in-situ experiments. For this purpose, **six groups of 11 rats** of maximal 16 weeks old will be used. The stretch magnitudes that yield similar force responses from the muscles, will be selected for the RCT.

Figure 2 shows the chronologic order of procedures performed in the randomized controlled trial. The procedures described in Table 1. to 4. will be performed in all groups. The terminal procedure described in Table 5. or in Table 6. will be performed prior to tissue extraction (Table 7.), because muscle mechanical and sensory properties cannot be performed on the same animals, because each assessment requires a full day of measurements. A graphical representation of the distribution of animals among the three groups is shown in Figure 3.

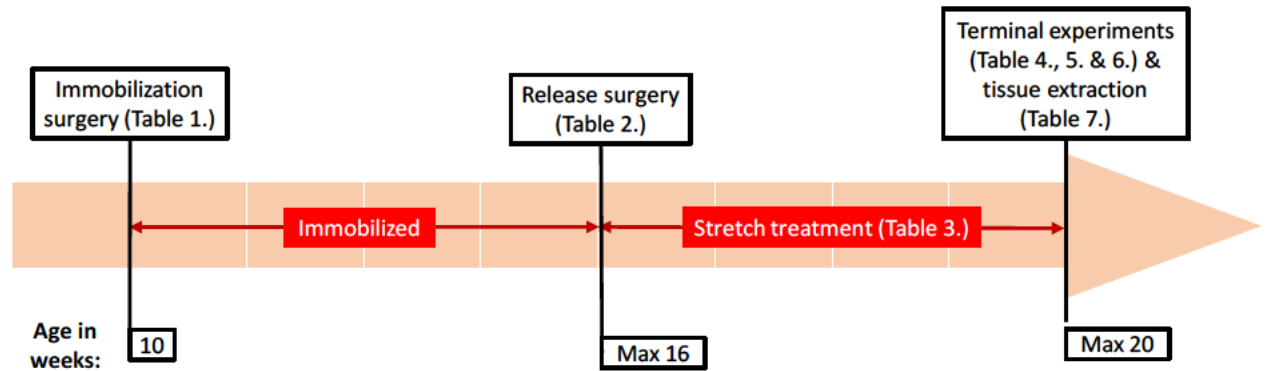


Figure 2. Time path of the randomized controlled trial.

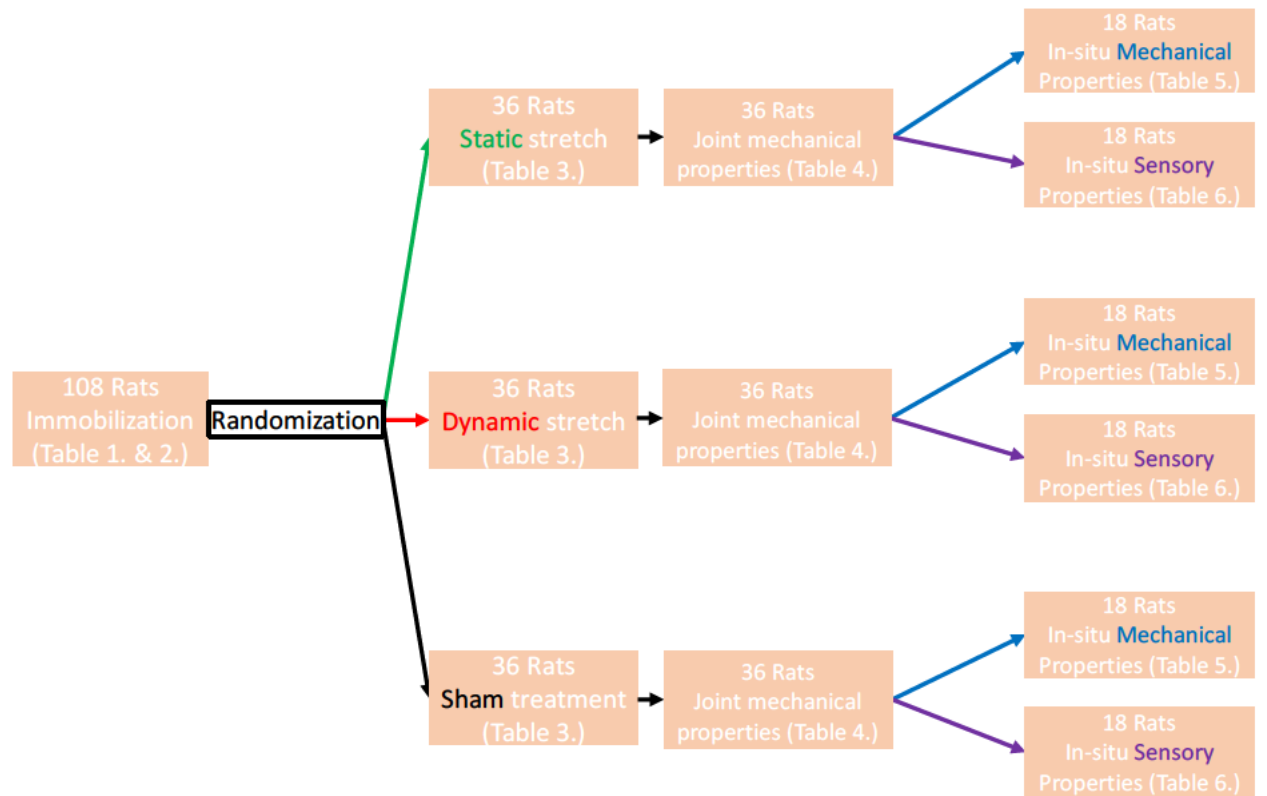


Figure 3. Flow chart of distribution of rats among the three groups in the randomized controlled trial

Table 1. Surgery for immobilization of ankle joint

Procedure	Frequency & duration	Groups, N per group	Age
Survival surgery under aseptic conditions, with the animal under deep anaesthesia to immobilise the right ankle in plantarflexion with a suture through a ligament of the knee and soft tissue at the heel bone. We have shown that <b>immobilization with an internal suture</b> is effective to induce a joint contracture in the rat. Because no external material (plaster or tape) is applied, the rat will have no urge to start gnawing. Therefore, this approach is considered less stressful than applying a cast on the outside of the limb.	Once, max. 90 min	3 groups, 36 per group, 108 total	10 weeks

*Table 2. Surgery to release immobilization*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
Survival surgery under aseptic conditions and with the animal under deep anaesthesia to release the suture that was applied to immobilize the ankle joint (see Table 1.).	Once, max. 60 min	3 groups, 36 per group, 108 total	Max 16 weeks

*Table 3. Stretch treatment*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
While the rats are sedated, two types of treatments will be applied to stretch the ankle plantar-flexors using a custom-built device. In the static stretch group, the ankle will be held at a constant angle (constant strain) and in the dynamic stretch group a constant ankle joint torque (constant stress) will be applied. Based on the ankle torque at the end range of movement of the ankle joint ( <b>measured with the same device before each stretch treatment</b> ), the magnitude of each treatment will be selected. The sham treatment group will only be sedated but shall receive no stretch treatment.	Daily for 4 weeks, max. 120 min	3 groups, 36 per group, 108 total	Max 20 weeks

*Table 4. In-vivo joint mechanical properties*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
While the rats are sedated, the joint mechanical properties (i.e. range of motion and torque) will be measured using the custom-build device described in Table 3.	Once, max. 15 min	3 groups, 36 per group, 108 total	Max 20 weeks

*Table 5. In-situ muscle mechanical properties*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
The muscle-tendon unit mechanical properties will be assessed during a terminal experiment while the rats are deeply anesthetized. The muscle-tendon units of the plantar-flexors will carefully be dissected free without damaging nerves and blood vessels. Their distal tendon will be connected to a servomotor. The sciatic nerve will be stimulated with a cuff electrode to elicit muscle contractions at different lengths and velocities.	Once, max. 15 hours	3 groups, 18 per group, 54 total	Max 20 weeks

*Table 6. In-situ muscle sensory properties*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
With the animal under deep anaesthesia, firing of single muscle spindles and tendon organs in response to various mechanical stimuli will be assessed. The ankle plantar-flexors will be dissected and connected to a servomotor. The lumbar dorsal roots containing the axons of the target muscle afferents will be exposed by laminectomy.	Once, max. 15 hours	3 groups, 18 per group, 54 total	Max 20 weeks

Table 7. Ex-vivo morphological and structural properties

Procedure	Frequency & duration	Groups, N per group	Age
The plantar flexors will be carefully excised while the rats are under deep anaesthesia without damaging the individual muscles and tendons for morphological analysis.	Once, max. 2 hours	3 groups, 18 per group, 54 total	Max 20 weeks

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

Prior to the randomized controlled trial, we will perform experiments to optimize the immobilization protocol (i) and the stretch treatment parameters (ii). For (i) we expect to need a maximum of **21 rats** (3 durations x (6 rats +10% for experimental failure) = 21). To optimize the stretch treatment (ii) we expect to need a maximum of **66 rats**. We will test 3 different loads for static stretch (constant strain) and 3 different loads for dynamic stretching (constant stress). We expect to need a maximum of 10 rats for each condition and, thus, "6 conditions x (10 rats +10% for experimental failure) = 66 rats". By optimizing the stretch treatment we minimize the amount of groups and, hence, number of rats required for the main study.

The required number of animals for the Randomized controlled trial is based on a power analysis. The power analysis has been based on a one-way ANOVA performed with data (mean and SD) from studies that measured range of motion, length-force characteristics, muscle length, sarcomere number and muscle sensor firing properties (Coutinho et al, 2004, *Braz. J. Med. Biol. Res*; Olesen et al, 2014, *J Appl Physiol*; Tinklenberg et al, 2018 *Muscle Nerve*, Vincent et al, 2017, *J Neurophysiol*), with three groups, a power of 0.8 and an alpha of 0.05. We used data of untreated and treatment groups when available and if unavailable we expected a 40% treatment effect and a 20% difference between the two different treatments. The analysis revealed the highest number of required observations (n) for the length-force characteristics: a minimum sample size of 54 (16 rats per group + 10% for experimental failure = 18 per group). Because the muscle mechanical and sensory properties cannot be assessed in the same animals, a maximal total of **108 rats** will be required.

Thus, in total a maximum of **195 rats** will be required.

## B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

### Species

For this study, we will use conventional male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), which are commercially available at recognized breeders. The animals are 10 weeks of age at the start of the study. At this age, the animals are mature and have a fully developed musculoskeletal system. Only male rats will be used to reduce variability. The hormone cycle of female rats has a substantial effect on muscle force capacity and overall tissue compliance and, hence, including females will increase variability. We don't expect that the minor genetic differences within the male Wistar rats will be able to influence the specific outcome parameters and hence don't deem it necessary to use specific inbred strains.

### Numbers

As described above in A., the power analysis revealed that our study requires a maximum of **195 rats**.



Table 8: Overview of the maximum number of animals used for optimization of and for main study (also see Figure 3).

	Groups	Number of animals per group +10%*	Total
Optimization of stretch parameters	6	11	66
Optimization of immobilization	3	7	21
<i>RCT: Muscle mechanical properties</i>	3	18	54
<i>RCT: Muscle sensory properties</i>	3	18	54
<b>Total</b>			<b>195</b>

\* For experimental failure, i.e. for potential losses or failure of data collection due to adverse events during surgeries and experiments.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. 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

-It is possible to assess tissue mechanics and sensory feedback in vitro using dissected muscle and/or tendon fascicles, but not as a complete organ in relation to the whole organism with an intact neurovascular system. There is also no replacement available to investigate the long-term adaptation of muscle and tendon tissues in response to joint immobilization, including the effects of changes of the behaviour of the animal. Note that for in-vitro experiments the tissues still need to be harvested from live animals.

-Besides in vitro experiments, mathematical models may serve to replace in vivo experiments on live animals. However, mathematical models can only be used to study the acute effects of changes in joint position, but not to study tissue adaptation. The dataset obtained in this project may be a step towards the development of a musculoskeletal model that can simulate effects of stretching on muscle properties. This may eventually lead to replacement of animal studies.

-Obtaining accurate assessments of length-force and force-velocity characteristics, or sensory feedback of individual muscles in patients with a contracture is not possible. This would require invasive measurements than can only be applied during surgical procedures. To assess changes in muscle morphological properties, muscle tissue needs to be harvested. This requires invasive procedures that damage the muscle and may be painful. Even though muscle biopsies are performed in human subjects, we deem these procedures not ethical for people with contractures, especially not in one of the most important indications, i.e. in children with cerebral palsy. With non-invasive methods, such as ultrasonography, changes in the length of muscle and tendon can be measured. However, with these procedures, it is not possible to assess changes in morphological, mechanical and sensory properties of the stretched muscles. In addition, the patient population is very heterogeneous. Therefore, addressing our research questions will require using a homogeneous animal model so that a better understanding regarding the aforementioned topics can be obtained.

### **Reduction**

- Before starting the experiments, rat cadavers from other experiments will be used for a detailed study of the anatomy and to practice all the surgical procedures for this project.
- Power analyses based on data of former immobilization and stretch experiments with rats have been performed to make sure that enough animals will be used for the primary outcome parameters and that no unnecessarily high numbers of animals will be killed.
- Only males will be used for this study and all the animals will be sheltered, fed and cared for with standardized methods by experience personnel to limit inter-subject variability.
- Prior to the stretch treatment study, we will perform experiments to optimize the duration of the immobilization protocol and the stretch treatment parameters. This will help us to select the most useful conditions for the main study, thereby, reducing the sample size.
- Much is already known about this animal model (*Rattus norvegicus albinus*), so basic properties do not have to be investigated anymore. Also, there is ample experience with both in situ and in vivo experimental procedures using this species in our laboratory.
- Multiple measurements will be performed on a single animal without increasing their suffering to optimize their usefulness and reduce the number of necessary animals.
- Not all animals will enter the experimental timeline simultaneously. This allows us to monitor the acquired power using the standard deviation of the actual experimental groups and stop with including more animals if the power has been achieved.

### **Refinement**

- A rat model is chosen because muscle tissue properties and structure are comparable to those of humans. Also, our lab has ample experience with the proposed procedures and the appropriate infrastructure for this model.
- The method of immobilization to induce a joint contracture is tolerated very well by the animals, in contrast to classical approaches such as plaster casting. Because the animals will not try to remove the "cast" by gnawing and biting, there is no need for extra anaesthesia and analgesia and procedures to replace it except for during the surgery. Thus, this method of immobilization diminishes the frequency of stressful situations and, thus, will involve less animal suffering.
- We will use advanced and refined techniques and equipment to measure the mechanical and sensory outcome parameters that will deliver very consistent data with the minimal amount of suffering possible (terminal anaesthesia).
- The parameters (i.e. magnitude) for the stretching protocols will be optimized prior to the main experiment. This reduces the amount of treatment groups and, thus, the total amount of animals that will undergo the moderate suffering associated with the main study.
- All surgical procedures will be practised and refined on cadavers before any surgery is performed on live animals.

---

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

---

- The animals will be controlled daily by qualified caretakers, technical staff and/or researchers.
  - The animals will be weighed regularly to control that they eat enough.
  - The sutured wounds will be inspected daily for possible adverse developments (e.g. infection).
  - Anaesthesia, analgesia and sedation will be applied where necessary to limit suffering, pain and fear.
  - During surgery the body temperature will be maintained at 37°C with a heating pad.
  - Animals will be housed in pairs.
  - The animals will be monitored carefully during all procedures.
  - Enrichments will be added to their cages to improve the animals their wellbeing.
  - The animals will be handled frequently for this research, to minimize the stress caused by the frequent handling of the animals. All experiments will be performed under supervision of a trained researcher and the animals will be gradually exposed to the researchers that perform the procedures to get used to them.
-

## Repetition and duplication

### E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Literature searches have been performed in multiple databases to define the study aims, methods and outcome parameters. We have not encountered any studies describing the experiments proposed and are not aware based on our scientific contacts that these experiments are planned elsewhere.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### G. 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 H.

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.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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.

Anaesthetics and (largely perioperatively) analgesics will be used during the immobilization and relieve surgeries, as well as during the terminal muscle mechanics and sensory feedback experiments.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possibly, the wounds of the surgeries for joint immobilization and release may be infected, but this is very rarely observed (<3%).

Explain why these effects may emerge.

The surgeries will be performed under aseptic conditions, but in the exceptional case (<3%) that bacteria are present an infection may develop. If detected the infection will be treated with antibiotics so that the experiment can be completed.

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

The rats will be monitored on a regular basis and inspected closely after the surgery to ensure their wound recovery, health and welfare. Their wounds will be treated with a combination of betadine and prontosan or with Hibicet after every surgery to diminish the risk of infection. In case of an infection the wound will be treated and appropriate medication (advised by the veterinarian) will be administered.

#### J. 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 K.

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

Other than adverse reactions caused by the survival surgeries are not expected. In case other adverse events occur, the following humane endpoints will be applied: Weight loss of  $\geq 20\%$  of the maximum weight or of  $\geq 15\%$  in 2 days. Other observations which are signs of suffering and pain such as abnormal posture unrelated to the intervention (crouched back), substantially reduced activity, signs of compromised health (bad fur, hair loss, diarrhea) or persistent infection.

Indicate the likely incidence.

There is a very low chance (<1%) that the animals will show these signs. In the past >10 years in which similar procedures have been performed in many animals (>100), only in one case the experiment was terminated due to a humane endpoint.

#### K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Table 9. depicts the different procedures and the associated level of discomfort and the percentage of the animals that will undergo this amount of discomfort.

Table 9.

Procedure	Level of discomfort	Percentage of animals
Surgery for immobilization of ankle joint	Moderate	65% (10% optimization i, 55% RCT)
Surgery to release immobilization	Moderate	65% (10% optimization i, 55% RCT)
Stretch treatment	Moderate	55% (RCT)
In vivo joint mechanical properties	Moderate	65% (10% optimization i, 55% RCT)
In situ muscle mechanical and sensory properties	Mild	65% (10% optimization i, 55% RCT)
In situ muscle mechanical properties (optimization ii)	Non-recovery	35% (optimization ii)

The cumulative discomfort of the animals will be maximally moderate for 65% and non-recovery for the other 35%.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

After the stretching intervention, terminal measurements will be performed to assess the effects on the mechanical and sensory muscles properties. Subsequently, muscle and tendon tissues will be harvested for histological and biochemical analysis, and the animals will be terminated.

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

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

Yes



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project    | Het effect van rekken op gewrichts- en spiereigenschappen bij een dwangstand van een gewricht |
| 1.2 Looptijd van het project | 4 jaar  |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Rekken, spierverskorting, gewrichtsmobiliteit, peesverkorting, spierstijfheid                 |

### 2 Categorie van het project

- |  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.<br><br><i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

### 3 Projectbeschrijving

- |   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Wanneer een gewricht langdurig in een bepaalde stand blijft staan, kan er een verkorting van de spieren en pezen ontstaan. Hierdoor kan een gewricht in een dwangstand komen, dit heet een contractuur. Spieren en pezen kunnen verkorten bij een dergelijke dwangstand dat zorgt voor een verminderde bewegelijkheid en verhoogde stijfheid van gewrichten. De bewegelijkheid van een gewricht kan zo verminderd zijn dat patiënten moeite kunnen hebben met veel dagelijkse activiteiten, zoals lopen of aankleden. Contracturen komen bij veel verschillende ziektebeelden voor waarbij het zenuwstelsel en/of het spier-skeletstelsel aangedaan is, zoals bijvoorbeeld na een beroerte of na het zetten van een kunstknie. Bij veel patiënten met een |
|---|---|

contractuur wordt therapie gegeven in de vorm van rekbehandelingen. Het doel hiervan is de verkorte spieren en pezen weer langer te maken.

Er zijn verschillende vormen van rekken. Er kan bijvoorbeeld gerekt worden door met veel kracht het gewricht naar de eindstand te brengen en vervolgens het gewricht vast te zetten met bijvoorbeeld gips. Er kan ook gerekt worden door een constante lichte kracht uit te oefenen op het gewricht door middel van een spalk met een veer. Beide manieren worden regelmatig toegepast, maar het is niet bekend welke van deze twee manieren het beste resultaat geeft. Ook is niet bekend met hoeveel kracht, hoe lang en hoe vaak er het beste gerekt kan worden, en wat het effect is van deze verschillende rekmethoden op spierfunctie. In dit project bestuderen we hoe spier- en peesweefsel zich aanpast bij verschillende rekbehandelingen na het opleggen van een contractuur.

We zullen dit onderzoeken door eerst een contractuur te veroorzaken in het enkelgewricht van een rat. Daarna krijgen de ratten dagelijks voor 4 weken 2 uur per dag verschillende rekbehandelingen of een placebo behandeling. Hierna wordt bij de ratten onder algehele narcose de eindstand van het gewricht, de spier(vezel)- en peeslengte, de spierkracht en sensorische functie gemeten. Nadat de spieren uit het dier zijn gehaald wordt het dier gedood met een overdosis van het narcosemiddel.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Met deze studie wordt er meer kennis vergaard over de manier waarop pezen en skeletspieren en de signalen die ze versturen zich aanpassen wanneer ze worden blootgesteld aan rek als er sprake is van een contractuur. Het voorgestelde diermodel geeft de mogelijkheid tot een gedetailleerde studie waarin niet alleen de gevolgen voor de eigenschappen van het gewricht bepaald kunnen worden, maar ook die van de spieren en pezen. De uitkomsten van dit onderzoek zullen een beter beeld geven van het type behandeling waarmee de beste resultaten worden behaald.

Contracturen komen voor bij veel verschillende aandoeningen van neurologische aard en van het spierskeletstelsel. Zo komen contracturen in 80% van in het ziekenhuis opgenomen patiënten met hersenletsel voor. Op dit moment is niet duidelijk welke methode van rekken het beste resultaat geeft en waarom. Zo wordt nu de opgelegde kracht en de methode van de rek behandeling gebaseerd op de voorkeur van de behandelaar en de verdraagzaamheid jegens rek van de patiënt in plaats van wat het beste resultaat biedt voor de gewrichten en spieren. Een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen helpt de behandelaar bij het kiezen van de beste behandelingsmethode voor de patiënt. De uitkomsten uit deze studie zullen gebruikt worden om de variabelen te optimaliseren in een humane studie.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Maximaal 195 ratten zullen worden gebruikt.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De meerderheid van de dieren (65%) zal matig ongerief ervaren veroorzaakt door de contractuuroperatie en de rekbehandeling. De ingrepen zijn klein en van korte duur, en naderhand kan de rat met rust gelaten worden. Licht ongerief wordt veroorzaakt door de verdoving die wordt gegeven voor de terminale meting waarna het dier wordt dood gemaakt. Een deel van de dieren (35%) ondergaat alleen terminaal ongerief als gevolg van het doden onder anesthesie.

- |   |   |
|---|---|
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Het ongerief is matig bij 65% procent van de dieren en het ongerief is terminaal bij de overige 35%. Alle dieren worden na de handeling onder volledige narcose gedood. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?                               | De dieren worden na afloop van de experimenten gedood, waarna weefsel wordt gebruikt voor onderzoek.  |

## 4 Drie V's

- |  |  |
|--|--|
| <p>4.1 <b>Vervanging</b><br/>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>     | <p>Dit onderzoek moet bij dieren worden uitgevoerd om het proces van weefsel aanpassing bij rekken te kunnen nabootsen en de eigenschappen van de betrokken weefsels gedetailleerd te kunnen onderzoeken. Dit kan niet met celkweek, omdat het niet mogelijk is om hele spieren te kweken en langdurig in leven te houden. Ook de spierweefselmonsters (biopten) die bij mensen kunnen worden afgenomen zijn te klein. Er zijn wiskundige modellen ontworpen die spier en pees gedrag kunnen nabootsen, maar er zijn geen modellen waarmee veranderingen in dat weefsel gesimuleerd kunnen worden.</p>   |
| <p>4.2 <b>Vermindering</b><br/>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>   | <p>Het onderzoek wordt uitgevoerd met behulp van 'standard operating procedures' om variatie tussen individuele experimenten te voorkomen. Doormiddel van een statistische analyse en gefaseerde opzet wordt gewaarborgd dat het optimale aantal dieren wordt gebruikt. Het aantal dieren wordt verder beperkt door alle procedures eerst uitvoerig te oefenen op dode dieren uit andere studies. Ook worden de kracht en duur van de rekbehandeling geoptimaliseerd om het aantal behandelgroepen laag te houden. Er worden meerdere metingen uitgevoerd op één dier.</p>   |
| <p>4.3 <b>Verfijning</b><br/>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p> | <p>Er is veel ervaring met de voorgestelde procedures en het proefdiermodel in ons laboratorium. Muizen zijn te klein voor het goed uitvoeren van de experimentele procedures. Het spierweefsel en de bouw van de skeletspieren van de rat zijn voor het grootste deel vergelijkbaar met die van de mens. Ook zijn de fysiologische mechanismen die betrokken zijn bij de aanpassingen van spieren en pezen door rek hetzelfde.</p>  |
| <p>Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.</p>                       | <p>Alle handelingen zullen worden uitgevoerd door gekwalificeerd personeel met veel ervaring in de specifieke handelingen. Bij de operaties wordt algehele anesthesie en effectieve pijnbestrijding toegepast. Alle dieren worden continu gemonitord op een aantal belangrijke kenmerken, waaronder welzijn, om het ongerief bij de dieren zoveel mogelijk te kunnen beperken. Bij hoger ongerief dan verwacht worden de humane eindpunten toegepast. De rek behandeling wordt toegepast terwijl de ratten licht verdoofd zijn zodat ze niet merken dat ze vast zitten en zo min mogelijk ongerief ervaren (matig ongerief). Vooraf worden de verschillende rek protocollen verfijnd in optimalisatie protocollen. Hierdoor zullen minder verschillende rek-behandelingen getest hoeven te worden.</p> |



---

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 10 februari 2021 09:03  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** AVD 5.1 lid2h 202114471  
**Bijlagen:** NTS\_Rekken\_gewricht\_29\_01\_2.pdf; Project\_proposal\_Rekken\_gewricht\_29\_01\_2.pdf; Aanvraag\_Projectvergunning\_format\_new\_5.1 lid2h\_Rekken\_gewricht\_2.pdf; Appendix\_1\_Rekken\_gewricht\_29\_01\_2.pdf

**Urgentie:** Hoog

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202114471.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 05-02-2021, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 05-02-2021 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

Het NVWA nummer is 5.1 lid2h AVD5.1 lid2h 202114471

2. Titel van het project:

*Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures*

3. Titel van de NTS:

*Het effect van rekken op gewrichts- en spiereigenschappen bij een dwangstand van een gewricht*

4. Type aanvraag:

*Nieuwe aanvraag projectvergunning*

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: 5.1 lid2h
- telefoonnummer contactpersoon: 5.1 lid2e
- e-mailadres contactpersoon: 5.1 lid2h

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

- ontvangen door DEC: 05/02/2021
- aanvraag compleet: 05/02/2021
- in vergadering besproken: 09/02/2021
- anderszins behandeld: n.v.t
- termijnonderbreking(en) van/tot: 16/02/2021 tot 30/03/2021 en 9/4/2021 tot 30/4/2021
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
- aanpassing aanvraag: 30/4/2021
- advies aan CCD: 07/05/2021

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

-Datum advies IvD: 02/02/2021

-Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager:

Aanvullende vragen van de DEC: vraagronde 1

- Datum: 16/02/2021

- *Strekking gestelde vragen: 1) Bij 3.1 en de 3V's: De DEC vraagt zich af of een deel van deze proeven niet in humane patiënten kan worden uitgevoerd? Waarom is deze vergelijking van behandelingen niet mogelijk in de patiënten? De DEC ziet hier graag meer argumenten voor de noodzaak van het onderzoek in dieren, waarom is er geen vervanging (in vitro of in de humane patiënt) mogelijk? 2) Bij 3.2 staat "our approach for immobilization to obtain a joint contracture has been successfully applied in previous studies" waarom wil men nu dan weer opnieuw een model opzetten? Is het nu een andere*

techniek? Of gaat het om dezelfde technieken maar in een andere vorm? Graag de keuze voor dit specifieke diermodel meer beargumenteren. 3) Kijkt men ook aan het einde van de proef naar het effect op functionele parameters? Kijkt men aan het einde van de proeven naar de activiteit en het bewegen/lopen van de dieren? 4) Bijlage onderdeel A: Boven figuur 1 staat "immobilization 4-6 wk", waar is dit op gebaseerd? Op een pilot studie? Op literatuur van anderen? Op eerdere eigen ervaringen? Graag ziet de DEC hier een uitleg en referentie. 5) Bijlage onderdeel B: De DEC ziet hier graag meer onderbouwing voor de keuze van 1 geslacht. Is er een aantoonbaar verschil tussen vrouwen en mannen m.b.t. tot spieradaptatie?

- Datum: 30/03/2021

- Strekking van de antwoord(en): 1) Met echografie kan de globale architectuur van spieren (spierbundellengte en hoek) benaderd worden, maar voor dit project is het noodzakelijk om de structuur op microscopisch niveau te onderzoeken. Daarnaast is het voor het beantwoorden van onze onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor een dergelijke meting dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopsie zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is. In de revisie zijn deze argumenten toegevoegd aan 3.1 en de 3V's (Vervanging). 2) De rat is het kleinste representatieve diermodel (anatomisch en fysiologisch), waarin we de voorgestelde procedures goed kunnen uitvoeren. Er is een grote hoeveelheid kennis aanwezig over dit diermodel en de te onderzoeken structuren en weefsels in ons lab en in de rest van de wereld. Over de methode van immobilisatie lijkt enige verwarring te zijn ontstaan. We passen een operatie techniek toe in de achterpoot die door ons team in het verleden in de voorpoot is gebruikt. We zullen de beweegmogelijkheid van één enkelgewricht beperken door middels een operatie onderhuids een strakke hechting te plaatsen tussen een knieband en het weefsel naast het hielbeen. We doen dit in één enkelgewricht omdat we de in situ metingen om de kracht-lengte en snelheids-lengte relaties van de kuitspier maar op één poot kunnen uitvoeren vanwege de duur van deze metingen. Daarnaast kan de rat dan nog de contralaterale achterpoot op normale manier gebruiken. We willen dus geen nieuw model opzetten. Hetgeen we willen optimaliseren is de duur van de immobilisatie. De beschrijving van de immobilisatiemethode in 3.2 haalbaarheid is verduidelijkt. 3) In dit onderzoek is de functionele uitkomstmaat het bewegingsbereik 'range of motion' in het gewricht waarin de contractuur aanwezig is (de enkel). De effecten van de contractuur en de rekbehandeling op het lopen of andere motorische taken zullen niet worden onderzocht. Gezien de intensiteit van het huidige protocol zou daarvoor een aparte studie bij een extra groep dieren uitgevoerd moeten worden. Aangezien de relatie tussen gewrichtsmobiliteit en lopen al eerder is bestudeerd bij patiënten, vinden we dit niet gelegitimeerd. Als we de mechanismen van de verschillende rekmethodes beter begrijpen, dan zullen deze vervolgens verder worden onderzocht bij patiënten met een contractuur. 4) De 4 tot 6 weken immobilisatie is gebaseerd op eerder onderzoek waarbij rattenpoten zijn geïmmobiliseerd. Het doel van de immobilisatie in ons project is het toebrengen van een substantiële blijvende contractuur. Zie onderdeel A. 5) Het is aangetoond dat de menstruatie cyclus effect heeft op spierkracht en spieradaptatie bij training in vrouwen. Ook vrouwelijke ratten hebben een cyclus. Om deze reden achten wij het raadzaam om enkel ratten van het mannelijke geslacht te includeren. De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag (zie de rode tekst in de documenten).

Aanvullende vragen van de DEC: vraagronde 2

- Datum: 9/4/2021

- *Strekking gestelde vragen: Het antwoord op de vraag waarom alleen mannen gebruikt worden is te beperkt onderbouwd. Het klopt dat vrouwen (en dus ook vrouwtjes ratten) een cyclus hebben, maar dit lijkt mij niet voldoende onderbouwing om vrouwen niet mee te nemen in het onderzoek. Zoals het nu beschreven is, lijken de resultaten niet transleerbaar naar de vrouw, wat de wetenschappelijke toevoeging verder beperkt.*

- *Datum: 30/4/2021*

- *Strekking van de antwoord(en): Na opnieuw grondig bestuderen van de wetenschappelijke literatuur hebben we gevonden dat bij spieractivatie door elektrostimulatie (dus niet vrijwillig) er geen effect is van de hormonale cyclus op maximale spierkracht. In tegenstelling, bij vrijwillige contractie wordt niet altijd de volledige neurale activatie behaald en kun je niet goed vaststellen of de uitgeoefende kracht de daadwerkelijke maximale capaciteit is van de geactiveerde spieren. In ons onderzoek maken we ook gebruik van elektrostimulatie. Om deze reden hebben we besloten om beide geslachten evenredig te includeren in het onderzoek zodat het ook representatief is voor vrouwen.*

*De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag (zie de rode tekst in de documenten).*

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

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: n.v.t., geen van de DEC leden is betrokken bij dit project.*

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. *Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

*De doelstelling van dit project is het verkrijgen van inzicht in de effecten van twee verschillende rekbehandelingen (statische en dynamische) op de mechanische, sensorische en morfologische eigenschappen van het bewegingsapparaat bij een contractuur (van het enkelgewricht). Wanneer een gewricht langdurig in een bepaalde stand blijft staan, kan er een verkorting van de spieren en pezen ontstaan. Hierdoor kan een gewricht in een dwangstand komen, dit heet een contractuur.*

*In het algemeen is de DEC tevreden met het project, de doelen en strategie zijn helder, het is een toetsbaar geheel. Wel waren er nog vragen over vervanging, vermindering, haalbaarheid, het diermodel en de aantallen. De onderzoekers hebben de aanvraag hierna aangepast en de DEC is tevreden met de antwoorden. Na deze verbetering heeft de aanvraag een concrete doelstelling en kan het getypeerd worden als een project. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. *Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).: n.v.t.*

3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling van het project. Het betreft hier onderzoek naar het effect van rekken op gewrichts- en spiereigenschappen bij een dwangstand van een gewricht. Om hiermee een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen te krijgen, wat kan helpen bij het kiezen van de beste behandelmethodede voor de patiënt.*

### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

*Het directe doel van dit project is het onderzoeken van de effecten van rek op mechanische, sensorische en morfologische eigenschappen van het bewegingsapparaat bij contracturen. Het uiteindelijke doel is om nieuwe rekbehandelingen voor de mens te kunnen ontwikkelen. Het directe doel draagt eraan bij om het uiteindelijke doel te bereiken.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)

*De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn volgens de DEC: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten. De waarden voor de proefdieren zijn negatief: de dieren ondervinden handelingen wat zorgt voor ongerief. De waarden voor de onderzoekers zijn positief: vanwege de kennisontwikkeling over de onderliggende mechanismen, het sensorisch gedrag en aanpassingsvermogen van skeletspieren in reactie op verschillende rekbehandelingen bij een gewrichtscontractuur. De waarden voor de patiënten zijn positief: meer kennis helpt bij het kiezen van de beste behandelmethodede/rekbehandeling voor de patiënt.*

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: *n.v.t*

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

*De onderzoekers hebben ervaring met gelijkwaardige experimenten en diermodellen. De te gebruiken procedures en meettechnieken in dit project zijn in het verleden met succes door de onderzoekers geïmplementeerd. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Naar de overtuiging van de DEC beschikken de onderzoekers over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

*De strategie is duidelijk weergegeven, het project bevat 1 type dierproef. Voor de start van het hoofdexperiment, zullen eerst twee experimentele procedures worden geoptimaliseerd: de meest effectieve duur van de gewrichtsimmobilisatie (1) en de omvang van de gewrichtsbelasting (2). Pas na dit go/no go moment gaat men verder met het hoofdexperiment, waarbij de dieren een*



*contractuur krijgen waarna ze verschillende rekbehandelingen ondergaan. De dieren worden willekeurig verdeeld in 3 groepen: een statische rekbehandeling, dynamische rekbehandeling en controle (sham)behandeling. De dieren zullen worden blootgesteld aan de volgende procedures, in chronologische volgorde: Immobilisatie van de enkel, rekbehandeling (of controle), terminale metingen (onder narcose) en weefselextractie.*

*De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De gevraagde looptijd van 4 jaar acht de DEC reëel gezien de verschillende onderdelen en de financiële ondersteuning.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

*De locatie van de dierproef is binnen de instelling van de vergunninghouder. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De dieren krijgen adequate verdoving.*

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

*De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.*

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

*Het ongerief is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het cumulatieve ongerief is voor 66% van de dieren maximaal matig en voor 34% van de dieren maximaal terminaal.*

*Matig ongerief zal optreden als gevolg van de immobilisatieoperatie en door immobilisatie van de enkel. Daarnaast zorgen ook de rekbehandeling en de in vivo metingen voor matig ongerief. De rekbehandeling wordt toegepast terwijl de ratten licht verdoofd zijn zodat ze niet merken dat ze vast zitten en zo min mogelijk ongerief ervaren (matig ongerief). Licht en terminaal ongerief ontstaat als gevolg van de in situ mechanische metingen.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de immobilisatie van de enkel (één poot) en door de rekbehandelingen en metingen. De immobilisatie is een onderdeel van het diermodel en is daardoor niet te voorkomen, hierdoor zullen de dieren beperkt worden in hun bewegingsvrijheid.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

*Tijdens het onderzoek zullen de volgende humane eindpunten worden aangehouden: Gewichtsverlies van meer dan 20% van het maximale gewicht of meer dan 15% in 2 dagen. Een abnormale houding die geen verband houdt met de ingreep (ineengedoken rug), aanzienlijk*



*verminderde activiteit, tekenen van een aangetaste gezondheid (slechte vacht, haaruitval, diarree) of aanhoudende infectie. Deze zijn volgens de DEC goed gedefinieerd. Het verwachte percentage dat een humaan eindpunt kan bereiken is erg klein (kleiner dan 1%).*

### **3V's**

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.*

*Voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor dergelijke metingen dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopt zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is.*

*De keuze voor het gebruik van ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De rat is het kleinste representatieve diermodel (anatomisch en fysiologisch), waarin de voorgestelde procedures kunnen worden uitgevoerd. Er is een grote hoeveelheid kennis aanwezig over dit diermodel en de te onderzoeken structuren en weefsels. Het spierweefsel en de bouw van de skeletspieren van de rat zijn voor het grootste deel vergelijkbaar met die van de mens.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

*In het project wordt optimaal tegemoetgekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

*Door te werken met 'standard operating procedures' wordt variatie tussen de experimenten zoveel mogelijk voorkomen. Doormiddel van een statistische analyse en gefaseerde opzet wordt gewaarborgd dat het optimale aantal dieren wordt gebruikt. Het aantal dieren wordt verder beperkt door alle procedures eerst uitvoerig te oefenen op dode dieren uit andere studies. Er worden meerdere metingen uitgevoerd op één dier. Het maximale aantal dieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 195 ratten en acht dit aantal voldoende onderbouwd.*

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

*Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.*

*Alle handelingen worden uitgevoerd door gekwalificeerde medewerkers met ruime ervaring. Bij de operaties wordt algehele anesthesie en effectieve pijnbestrijding toegepast. De dieren zullen gedurende de behandeling goed in de gaten gehouden worden. Bij hoger ongerief dan verwacht worden de humane eindpunten toegepast.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe: *n.v.t.*

***Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef***

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

*Na vragen vanuit de DEC hebben de onderzoekers besloten beide geslachten te gebruiken, dus zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

*De dieren worden gedood om spier- en peesweefsels te verkrijgen voor histologische en biochemische analyse. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.*

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

***NTS***

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

*De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

**D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag

*Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de effecten van twee verschillende rekbehandelingen (statische en dynamische) op de mechanische, sensorische en morfologische eigenschappen van het bewegingsapparaat bij een contractuur (van het enkelgewricht) het gebruik van maximaal 195 ratten die hiervan terminaal tot matig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale

en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast, een deel van de dieren ondervindt maximaal terminaal ongerief (34%) en een deel ondervindt maximaal matig ongerief (66%). Dit zorgt voor veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de onderliggende mechanismen, het sensorisch gedrag en aanpassingsvermogen van skeletspieren in reactie op verschillende rekbehandelingen bij een gewrichtscontractuur. De waarde voor de patiënten is: de optimalisatie van rekbehandelingen, een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen helpt de behandelaar bij het kiezen van de beste behandelmethode voor de patiënt. De uitkomsten uit deze studie zullen gebruikt worden om de variabelen te optimaliseren in een humane studie. De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de maximaal 195 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is om meer kennis te verkrijgen over de manier waarop pezen en skeletspieren en de signalen die ze versturen zich aanpassen wanneer ze worden blootgesteld aan rek als er sprake is van een contractuur. Het verwachte resultaat, in het kader van het optimaliseren van rekbehandelingen in patiënten is afgewogen tegen het, terminaal tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

- (1) *Zowel het wetenschappelijk belang als het maatschappelijk belang zijn substantieel. Het maatschappelijk belang is groot, het is op dit moment niet duidelijk welke rekbehandeling het beste resultaat geeft en waarom. De uitkomsten van dit onderzoek zullen een beter beeld geven van het type behandeling waarmee de beste resultaten worden behaald. Het wetenschappelijk belang is ook groot, het voorgestelde diermodel geeft de mogelijkheid tot een gedetailleerde studie waarin niet alleen de gevolgen voor de eigenschappen van het gewricht bepaald kunnen worden, maar ook die van de spieren en pezen.*
- (2) *De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over genoeg ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Concluderend: Het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek weegt naar het oordeel van de DEC op tegen het gebruik van maximaal 195 ratten, en het daarbij verwachte terminale tot matige ongerief.*

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheid.*

*De meerderheid adviseert positief omdat het unilateraal rekken goed is onderbouwd als ook het gebruik van het aantal dieren en de keuze voor mannetjes. Het uitvoeren van deze experimenten bij patiënten is lastig i.v.m. met de grote variatie in de mate van contractuur en historie van behandeling van de patiënten. Daarbij speelt dat patiënten voetvormingen laten zien hetgeen een gecontroleerde belasting op de kuitspieren bemoeilijkt. Het gaat om de onderliggende mechanismen waarvoor read-outs nodig zijn die niet in de mens kunnen worden gebruikt. Met de variatie in patiënten door grote verschillen in de mate en aard van contractuur is een systematische vergelijking van behandelingen in patiënten nagenoeg niet mogelijk. De gesignaleerde mogelijke translatie-issues van rat naar mens zijn in dit project niet bijzonder anders dan bij andere diermodellen; verder is er al veel onderzoek met vergelijkbare modellen gedaan. Het enige punt van zorg is dat er onder algehele anesthesie gerekend wordt. Er zijn aanwijzingen in de literatuur dat spieractiviteit, hetzij vrijwillig of door rekreflex/fibrillaties, nodig is om lengteadaptaties te induceren. De vraag is of onder algehele anesthesie activatie door het triggeren van de rekreflex of door fibrillatie kan plaatsvinden? Dat antwoord is nu niet te geven. Voorgestelde experimenten zullen dan ook uitwijzen of er enig effect is van de rekbehandelingen onder gegeven condities. Onze expert verwacht dat daarmee de studie sowieso relevante kennis opleveren voor het behandelen van gewrichtscontracturen. De meerwaarde is voor de meerderheid voldoende duidelijk en weegt voldoende op tegen het ongerief van de 195 dieren; het cumulatieve ongerief, matig voor de meeste dieren, is correct ingeschat en komt niet in de buurt van wat je ernstig ongerief zou kunnen noemen. Proefopzet deugt en de doelstelling is haalbaar. Vandaar positief advies.*

*Eén lid kan zich hierin niet vinden, omdat de vraag blijft of het noodzakelijk is om de onderliggende mechanismen te onderzoeken voor het verbeteren van de rekprotocollen. Dit lid is van mening dat het ook mogelijk is om dit soort onderzoek naar rekprotocollen zonder proefdieren te doen. Het vergelijken van behandelprotocollen kan in principe ook bij patiënten gedaan worden. Uiteraard kan het zijn dat er door dit onderzoek een betere wetenschappelijke basis onder de behandeladviezen wordt gelegd. Maar dan blijft de vraag of dit opweegt tegen het doen van dierproeven omdat het doel (betere behandelprotocollen) ook anders kan worden bereikt.*

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B).

*Er is geen dilemma geconstateerd.*



## 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 our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Contractures are joint dysfunctions that are clinically characterized by a forced joint position, decreased joint range of motion, and increased joint stiffness (Katalinic et al, 2017, *J Physiother*; Nuckolls et al, 2020, *Muscle Nerve*). Contractures can cause cosmetic impairments, and functional impairments leading to a significant burden on patients due to decreased independence in activities of daily living. In more severe cases, a contracture can for instance result in losing the ability perform certain abilities of daily living such as the ability to dress independently or walk. Community participation can be reduced causing social isolation and a decreased quality of life (Nuckolls et al, 2020, *Muscle Nerve*).

Contractures affect many people in all age groups (from young children to older adults) suffering from a large variety of neurological and musculoskeletal disorders. Neurological disorders and muscle diseases causing contractures include spastic cerebral palsy, stroke, traumatic brain injury, spinal cord injury, spina bifida, Duchenne muscular dystrophy and Charcot-Marie-Tooth disease (Harvey et al, 2017, *J Physiother*). Contractures also often develop in response to musculoskeletal and skin conditions and complications such as osteoarthritis ankylosing spondylitis, Dupuytren, submucous fibrosis, total joint replacement, adhesive capsulitis, burns, scarification, immobilization, fracture, amputation and systemic sclerosis (Harvey et al, 2017, *J Physiother*). The total prevalence of contractures is not exactly known. The prevalence differs between the aforementioned disorders (from 15-80%), indicating that a large number of patients is affected. In burns victims, for example, the contracture prevalence at discharge is 38-54% (Oosterwijk et al, 2017, *Burns*). In spinal cord injury, major contractures occur in 15-30% of patients (Fergusson et al, 2007, *Clin Orthop Relat Res*). In a long term care facility for the elderly, 31% and 26% of the residents had upper extremity and lower extremity contractures respectively (Fergusson et al, 2007, *Clin Orthop Relat Res*). In Dutch nursing homes, 58% patients with central nervous system disorders have contractures (Meijer et al, 2017, *Disabil Rehabil*).

We published that contractures are caused by shortening of tissues spanning the joints, most notable muscles. This has significant functional consequences for the muscle and joint, such as limited shortening capacity, a shift in the joint angle-torque relationship (Kalkman et al, 2020, *Front Physiol*), and deficits in proprioception (i.e. sense of body position mediated by mechanosensors within muscles and joints) (Mahmud et al, 2017, *Clin Genet*). A commonly used treatment for contractures, aimed at increasing the joint range of motion and reducing joint stiffness, is **stretching**. Stretching acutely lengthens the muscle-tendon units spanning the joint. However, it is unknown how this stretch is distributed among muscle belly (i.e. muscle fibers) and tendon. For optimal effects on physical functioning, the muscle fibers should primarily be stretched (Kalkman et al, 2020, *Front Physiol*). Even though stretch treatments are often applied, there is no clear agreement about which type (e.g. static, dynamic) or dosage (frequency, duration, magnitude) results in the best long-term outcome of the treatment. Previous studies did usually not specify the magnitude of the stretch applied, or based it on the participants' perception and tolerance (Freitas et al, 2018, *Scand J Med Sci Sports*). Also the frequency and duration were highly variable among studies (*for review see* Katalinic et al, 2017, *J Physiother*). The modality (i.e. equipment used for imposing stretch) and corresponding type of stretch treatment used are often based on the equipment available in the clinic and/or the preference of the attending physician, instead of on what would lead to the most beneficial outcome regarding joint range of motion, as well as adaptations in muscle and tendon. **Two types of stretch treatment are frequently applied: (1) a static stretch in which constant strain is applied with an initially high load, whereafter the joint is held in this (usually end-range) position manually (i.e. by a physician), or with an orthosis or plaster cast, (2) a dynamic stretch with a constant torque around the joint applied manually or by an orthosis (Bhave et al, 2019, *Ann Transl Med.*; Farmer & James, 2001, *Disabil Rehabil*; Hösl et al, 2015, *J Child Orthop*).** The biomechanical conditions of the joint and muscle-tendon unit are different between these two types of treatment (Duenwald et al, 2009, *Ann biomed Eng*; Fung, 1967, *Am J Physiol*; Konrad et al, 2017, *Eur J Appl Physiol*; Magnusson et al, 1996, *Scand J Med Sci Sports*; Ryan et al, 2010, *Eur J Appl Physiol*; Taylor et al, 1990, *Am J Sports Med*). In static stretch, with the joint kept at a fixed angle (constant strain), the stress in the stretched structures decreases over time (a phenomenon called viscoelastic stress relaxation). During dynamic stretch, by application of a constant



torque around a joint, the stress remains constant and the strain in the structures increases over time (a phenomenon called viscoelastic creep).

Multiple studies in human subjects have shown that static stretch treatments have a positive effect on joint range of motion and on gait parameters (for review see Craig et al, 2016, *Pediatr Phys Ther*). However, there is also evidence indicating that dynamic stretching is more effective than static stretching (Light et al, 1984, *Phys Ther*; Yeh et al, 2007, *J Electromyogr Kinesiol*). It is unclear how muscle and tendon tissues respond to the different treatments. To further optimize stretch treatment in patients, more detailed knowledge about the effects of stretch interventions on the mechanical and morphological properties of skeletal muscle is needed.

Animal studies have shown that muscles undergo structural adaptations when exposed to stretch treatments. It has been found that sarcomeres (i.e. contractile elements of muscle fibers) are added at the end of muscle fibres after several weeks of stretch (De Jaeger et al., 1985, *J Appl Physiol*; Williams & Goldspink, 1973, *J Anat*) and that 30 minutes of stretch a day can prevent the loss of sarcomeres in series within muscle fibers during three weeks of immobilization (Williams, 1990, *Ann Rheum Dis*). It has also been shown that continuous stretch of the muscle-tendon unit due to a tendon transfer causes sarcomeres to be added in series followed by tendon lengthening (Takahashi et al., 2010, *J Bone Joint Surg Am*). The effects of stretch treatment on physical functioning do not depend only on changes in muscle structure, but also on changes in the mechanical and sensory muscle properties. However, the effects of stretch treatment on these muscle properties are still poorly understood. For a full understanding of stretch treatment, integrated studies including both muscle structure and function are required.

We choose to perform this research to assess the underlying mechanisms of different stretch protocols in the ankle joint and the plantar flexor muscles of the rat. The ankle joint, because of the frequent occurrence of ankle contractures. The rat model is selected, because of the anatomical and morphological similarities of these structures. In addition, there is ample knowledge about this musculoskeletal system of this model, in our laboratory we have the required equipment, knowledge and technical assistance to perform the mechanical, morphological and sensory measurements of skeletal muscle. For several reasons, it is deemed not possible to address the proposed questions by studies in human patients or using in vitro models. (a) It is critical to assess changes in the mechanical and sensory characteristics of individual muscles, which is not feasible in vivo. (b) Also using fibers from muscle biopsies has limitations. Recently, it has been shown that the mechanical properties of single muscle fibers are not representative for the whole muscle (Ward et al., 2020 *Front Physiol*). (c) Patients typically receive different modalities of treatment (i.e. surgery, medication, physiotherapy) in addition or prior to a stretch treatment. Therefore, it is virtually impossible to assess the effects of the stretch treatment.

This project is part of a larger research effort to optimize the treatment strategies for people with joint contractures. Our results will be used in a clinical study where plantar-flexors of children with cerebral palsy will be stretched, as well as for recommendations regarding the most beneficial type of stretch treatment in other patient groups.

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

#### Objectives

This project will provide more insight in mechanical, morphological and sensory adaptations of muscle-tendon units to long-term dynamic stretch (constant stress) treatment or long-term static stretch (constant strain) treatment in the presence of a joint contracture.

*The project consists of one study with a general aim and three sub-aims.* The general aim of this preclinical study is to reveal how muscle and tendon tissues adapt to different stretch treatments after induction of a contracture. The three sub-aims are as follows, 1) to investigate the effects of different stretch treatments on joint mechanical properties, 2) to assess how the mechanical and morphological properties of muscle and tendon adapt to different stretch treatments, and 3) to assess the effects of stretch treatment on changes in muscle sensory feedback.

#### Achievability

Our research group has ample experience with experiments similar to those proposed and all the necessary tools and equipment are available in our laboratory since former research has focussed on ankle and plantar flexor mechanics and sensory feedback of rats. Multiple publications in renowned, international, peer-reviewed journals exemplify our experience in the assessment of ankle joint mechanics, mechanics and morphology of the plantar-flexor muscles as well as sensory feedback using the rat model, in both healthy and pathological conditions (e.g. spasticity, stroke, tendon transfer). The rat is deemed the most suitable animal model for the proposed research since it is the smallest anatomical and physiological representative animal model in which the proposed experimental procedures can be accurately performed. Our lab and also other labs over the world possess ample knowledge about this animal model and the to be studied structures and tissues.

Also, our approach for immobilization to obtain a joint contracture has been successfully applied in a different joint (the wrist) in previous studies by our research group. This approach will be adapted for application to the ankle joint. In short, a suture will be placed between a knee ligament and the tissue next to the heel bone to constrict the ankle range of motion. To sedate the animals for the stretch treatment, we will use isoflurane. This allows for passive stretching. Our team has ample experience with this type of sedation. After administration of the gas has stopped, the rats recover quickly and will behave normally. In short, all experimental procedures and measurement techniques to be applied in the present project have been implemented successfully by us in the past.

The duration of the project will be 4 years. All experiments in this project will be performed by one PhD student, who has recently been hired and is funded for 4 years. This student will be trained and assisted by a lab technician and supervised by an associate professor, who both have ample experience in all methods described above.

### 3.3 Relevance

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

#### Scientific relevance

The objectives have fundamental and translational scientific relevance. The fundamental scientific relevance is portrayed by enriching the knowledge of mechanical and sensory behaviour and adaptability of skeletal muscle in response to different stretch treatments in case of a joint contracture. The proposed animal model allows for a detailed study in which not only the joint level mechanics, but also the muscle mechanics, muscle morphological and sensory characteristics will be assessed. The translational scientific relevance is characterized by the application of the novel insights to future clinical studies. Specifically,



the findings of the proposed animal study will be used to define the parameters of muscle stretch in clinical research on the efficacy of stretch treatment in people with a joint contracture.

### **Social relevance**

The social relevance is characterized by the frequent application of stretch treatment to people with a joint contracture in the clinic. Currently, the dosage and type of the stretch treatment is determined subjectively, based on the tolerance of the patient, and the available material and/or preference of the attending physician. The better understanding of the effects of different types and dosages of stretch treatments, as obtained in the proposed study, will help for more objectively prescribing a specific treatment. With the data that we will collect, we expect to advise the clinic about the preferred method and optimal magnitude of the applied stretch. The method of defining the magnitude of the stretch can be directly applied in the clinic by measuring the passive ankle moment. These measurements will also take place in patients in the greater project of which this study is a component.

## **3.4 Research strategy**

### **3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).**

The project consists of one main study, a randomized controlled trial, investigating the effects of two different stretch-treatments (static stretch and dynamic stretch, see 3.1) on ~~male~~-Wistar rats with a contracture of the ankle joint. **Our main hypothesis is that the effects on mechanical, morphological and sensory muscle properties of dynamic stretch treatment will be greater than those of static stretch treatment.** We expect to use maximally 195 rats to attain the above-mentioned research aims (3.2). This project requires the optimization of some experimental procedures that will subsequently be applied in the randomized controlled trial (Figure 1).

### **Parameter optimization**

Prior to the start of the main study, optimization of two experimental procedures is required: (i) to define the most effective duration of the joint immobilization for induction of the joint contracture, and (ii) to define the most appropriate magnitude of joint loading to apply stretch in the static (constant strain) and dynamic (constant stress) stretch treatment groups. The outcome parameter for (i) is the range of motion of the ankle joint, for (ii) we will assess the mechanical response of muscle and tendon tissue to various stretch types and magnitudes.

### **Randomized controlled trial**

Rats will be randomly divided in **3 groups: a static stretch treatment, dynamic stretch treatment and sham treatment group.** The animals will be exposed to the following procedures (Figure 1), in chronological order:

- Immobilization of the right ankle
- Stretch treatment (or sham)
- Terminal experiments
- Tissue extraction

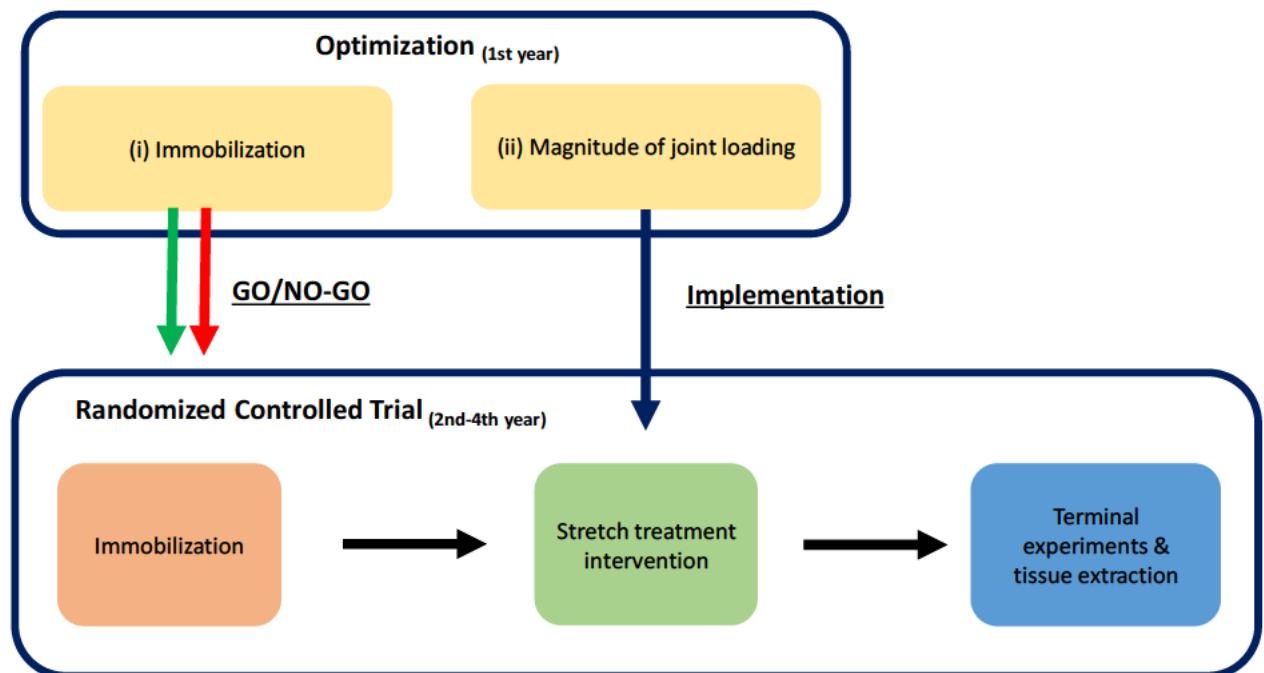


Figure 1: An overview of the overall design of the project.

### Overview of output variables

To attain our aims (3.2) and prove our main hypothesis we will measure the following variables:

1. *In-vivo joint mechanical properties*: ankle joint range of motion and the joint angle-torque relationship.
2. *In-situ muscle properties*.
  - a. *Mechanical properties*: length-force relationship, force-velocity relationship.
  - b. *Sensory properties*: the relationship between muscle length, muscle force and firing of muscle spindles and tendon organs.
3. *Ex-vivo morphological and structural properties*: muscle morphology (fiber length, number of sarcomeres in series, pennation angle) and muscle structure (connective tissue content, fiber type distribution).

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The animals in the RCT will be exposed to the following procedures (Figure 1), in chronological order:

#### Immobilization of the right ankle

The right ankle will be immobilized with a subdermal non-absorbable suture through a ligament of the knee and tissue next to the calcaneus. The suture will be pulled taut to generate a plantar flexion-torque (the toes point downward) and after the immobilization the suture will be cut. For both the immobilization and release surgery the animal will be anaesthetized. With this internal **immobilization method**, the animal will not experience the discomfort and stress of an external fixation such as a plaster cast. The animals often gnaw on the material of the external fixation (Williams & Goldspink, 1973, *J Anat*), and when the animal gathers girth (Reynolds et al, 1996, *J Orthop Sports Phys Ther*) the fixation needs to be renewed weekly. This causes unnecessary stress for the animal and more frequent application of anaesthetics. In our lab, we have shown that a comparable approach can successfully limit the range of motion of the wrist of the rat.

### Stretch treatment

The stretch treatment will occur on a daily basis, for maximum of 2 hours, after the immobilization is concluded. To perform the stretch treatment, the rat will be sedated with isoflurane and will be placed on a custom-built device with its foot strapped in a tray that rotates around the ankle joint (Figure 2). With this device ankle angle and joint torque can be controlled. Based on the ankle torque at the end range of joint movement, the magnitude of each treatment will be selected. The intensity of the stretch can be compared to when a human brings his/her ankle to maximal dorsiflexion by leaning forward to stretch the calf muscles.

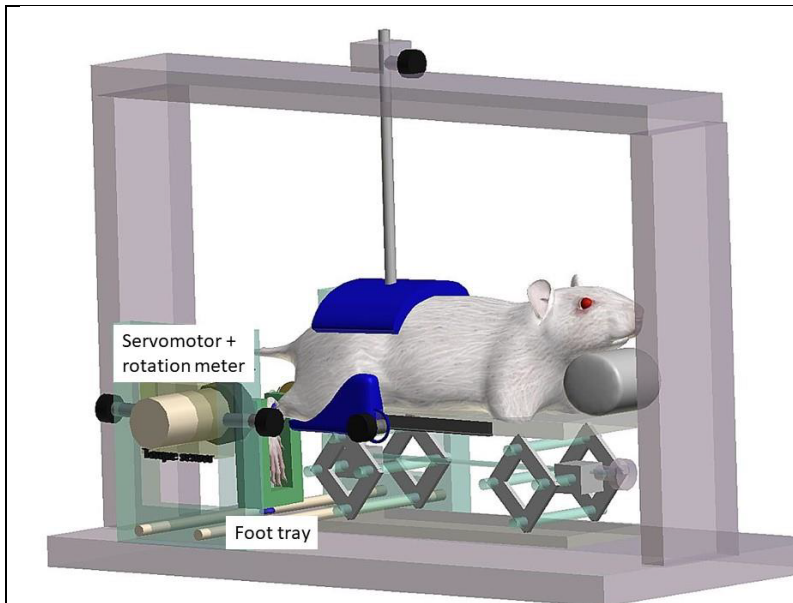


Figure 2: A drawing of the custom built device to stretch the ankle plantar flexors and to measure ankle mechanics.

### Terminal experiments

The animals will be deeply anesthetized. Ankle biomechanics (ankle joint range of motion and the angle-torque relationship) will be assessed with the same custom build device that will be used for the stretch treatment. The ankle will be brought into its end range of movement and the ankle angle and exerted torque will be measured while the rat is sedated. The severity of these measurements is classified as moderate, because the rats will be sedated and exposed to a painless measurement.

Subsequently, the passive and active mechanical properties of the plantar flexors will be assessed. The skin and the biceps femoris will be carefully removed without damaging nerves and blood vessels, to access the *triceps surae* (calf muscles). The plantar flexor muscles will be attached to a force transducer and servomotor. Under similar conditions as those described for assessment of mechanical muscle properties, firing of muscle sensors will be performed. Besides dissection of the muscles, also the lumbar dorsal roots containing the axons of the target muscle afferents will be exposed by laminectomy. **Muscle mechanical and sensory properties cannot be performed on the same animals**, because each assessment requires a full day of measurements.

### Tissue extraction

After measurements of the mechanical properties, the plantar-flexor muscles and several antagonistic muscles of the treated and the contralateral leg will be excised, for analysis of morphological and structural characteristics of the muscle belly and tendon.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

This project requires the optimization of some experimental procedures that will subsequently be applied in the randomized controlled trial. The general outline of the study is portrayed in Figure 1.

### **Parameter optimization**

Before we can start with the experiment to test the different stretch treatments we have to perform optimization experiments, which will take place in the first year of the study. These will consist of (i) experiments to **optimize the duration of the immobilization to induce a contracture**. Former research including immobilization studies in our lab indicate that our approach can result in a contracture, however in the unlikely case that none of the tested immobilization durations result in a substantial contracture this will result in a no-go. The second optimization experiment will consist of (ii) measurements of muscle mechanical properties with an emphasis on viscoelastic properties of the muscle-tendon unit to **optimize the magnitude of the muscle stretch procedures** in both types of stretch treatment.

### **Randomized Controlled Trial**

After optimization, the main study, a randomized controlled trial, will be performed in second to fourth year of the study. The therapeutic interventions in the randomized controlled trial consist of two different stretch treatments in rats with an induced joint contracture. Subsequently, terminal experiments will be performed in which the mechanical and sensory muscle properties will be assessed, and muscle and tendon tissues will be harvested for analysis of morphological and structural characteristics. See Figure 1 for a graphical overview of design of the project.

3.4.4 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	Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## 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, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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 overall objective is to reveal how muscle and tendon tissues adapt to different stretch treatments after induction of a joint contracture. With the experiments we can retrieve insight in the changes in joint and muscle-tendon unit mechanics, muscle morphology and sensory function when muscle-tendon units are stretched in the presence of a joint contracture. We will measure the following outcome parameters to address this objective:

1. *In vivo joint mechanical properties*: maximal joint range of motion and the passive ankle angle-torque relationship. These outcome parameters are affected by the stiffness of the structures spanning the ankle joint and, hence, will be used to assess the severity of the joint contracture (optimization study i) and the effects of the stretch treatment at the joint level.
2. *In-situ muscle properties*:
  - a. *mechanical properties*: length-force & force-velocity relationship. The muscles spanning the affected joint will be shortened and stiffened by the contracture. The goal of the stretch treatment is to bring back the muscles towards their normal length and stiffness (i.e. that before the joint contracture was induced). These parameters will characterize the effects of stretch treatment on the mechanical muscle properties.
  - b. *Sensory properties*: the relationship between muscle length, muscle force and firing of muscle spindles and tendon organs. Changes in muscle sensory function may be the

result of altered mechanical properties of muscle and/or tendon, but also of altered properties of the sensors. The goal of these measurements is to assess how the different stretching types affect sensory output, and if this is the result of changes in the muscle-tendon unit or muscle sensor.

3. *Ex-vivo morphological and structural characteristics: Morphology* (muscle, tendon & fiber length, number of sarcomeres in series, pennation angle) and *structure* (connective tissue content, fiber type distribution). Muscle morphology and structure are affected by joint contractures. The effects of stretch treatment on these outcome parameters will be assessed.

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

Prior to the randomized controlled trial (RCT), we will perform experiments to optimize the duration of the immobilization protocol (i) and the stretch treatment parameters (ii).

A schematic of optimization experiment (i) is shown in Figure 1. For details about the procedures see specified tables. Twenty-one rats will be divided in **three groups of seven rats**. Each group will be exposed to a different immobilization duration. The immobilization durations will be varied from 4 to 6 weeks. This duration is based on former research in which immobilization by casting for four weeks caused profound joint contractures (Ishikura et al, 2015, *J Phys Ther Sci*, Trudel et al, 2014, *Arch Phys Med Rehabil*). However, partial spontaneous recovery occurred (Trudel et al, 2014, *Arch Phys Med Rehabil*). Others showed that joint stiffness increases if immobilization is prolonged from 2 to 6 weeks (Reynolds et al, 1996, *J Orthop Sports Phys Ther*). The shortest duration with a significantly higher limitation in joint range of motion will be selected for the RCT. The exact age of the start of the stretch treatment (14, 15 or 16 weeks) and end of the stretch treatment (18, 19 or 20 weeks) will depend on the results of optimization (i).

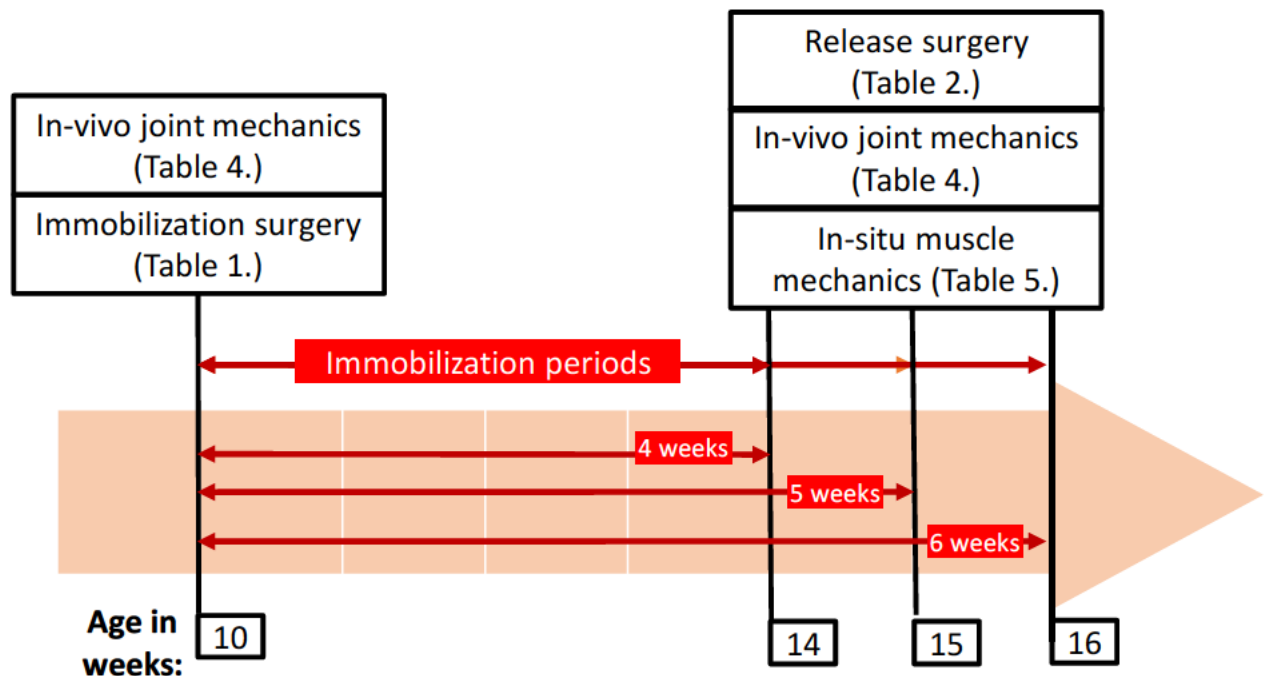


Figure 1. Optimization of duration of joint immobilization

The surgical procedures for (ii) are described in Table 5. Three different magnitudes of static and dynamic muscle stretch will be tested during in-situ experiments. For this purpose, **six groups of 11 rats** of maximal 16 weeks old will be used. The stretch magnitudes that yield similar force responses from the muscles, will be selected for the RCT.



Figure 2 shows the chronologic order of procedures performed in the randomized controlled trial. The procedures described in Table 1. to 4. will be performed in all groups (i.e. static stretch, dynamic stretch and sham treatment). The terminal procedure described in Table 5. or in Table 6. will be performed prior to tissue extraction (Table 7.), because muscle mechanical and sensory properties cannot be performed on the same animals, because each assessment requires a full day of measurements. A graphical representation of the distribution of animals among the three groups is shown in Figure 3.

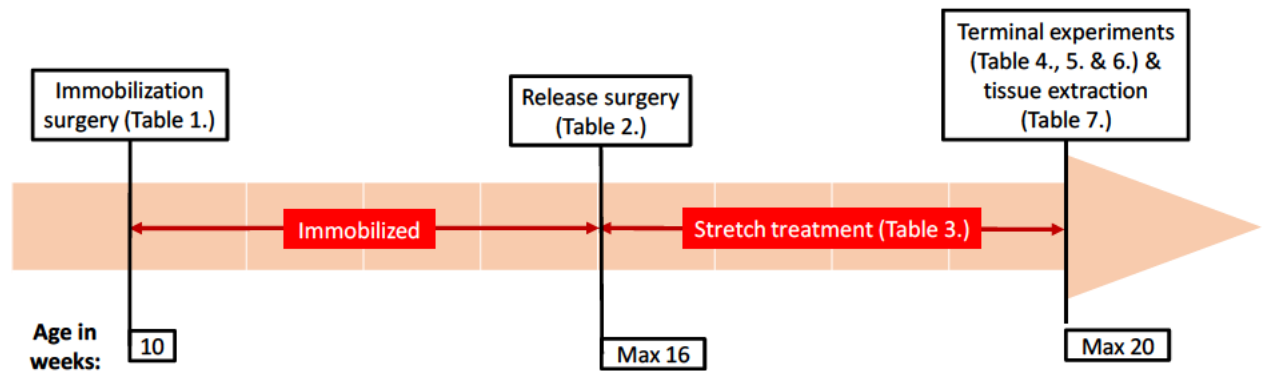


Figure 2. Time path of the randomized controlled trial.

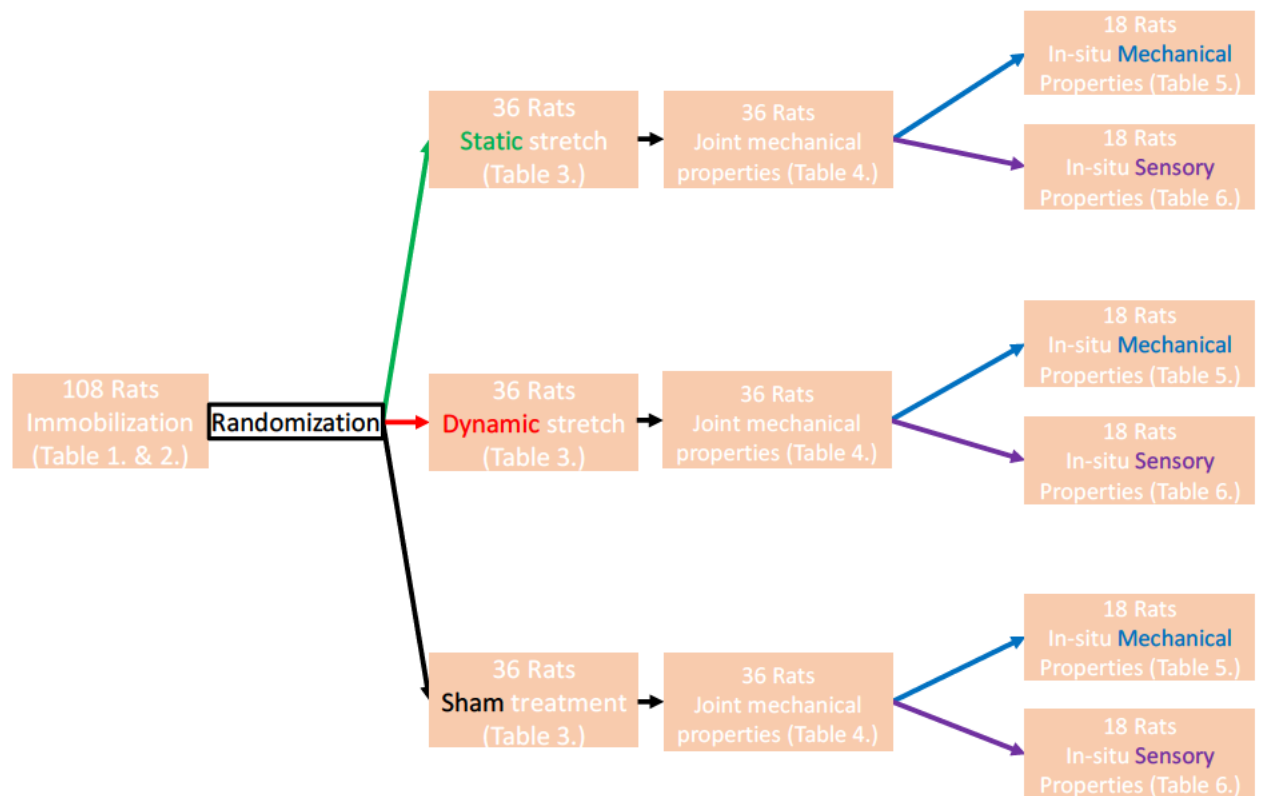


Figure 3. Flow chart of distribution of rats among the three groups in the randomized controlled trial

Table 1. Surgery for immobilization of ankle joint

Procedure	Frequency & duration	Groups, N per group	Age
Survival surgery under aseptic conditions, with the animal under deep anaesthesia (isoflurane) to immobilise the right ankle in plantarflexion with a suture through a ligament of the knee and soft tissue at the heel bone. We have shown that <b>immobilization with an internal suture</b> is effective	Once, max. 90 min	3 groups, 36 per group, 108 total	10 weeks

to induce a joint contracture in the rat. Because no external material (plaster or tape) is applied, the rat will have no urge to start gnawing. Therefore, this approach is considered less stressful than applying a cast on the outside of the limb.			
---	--	--	--

*Table 2. Surgery to release immobilization*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
Survival surgery under aseptic conditions and with the animal under deep anaesthesia (isoflurane) to release the suture that was applied to immobilize the right ankle joint (see Table 1.).	Once, max. 60 min	3 groups, 36 per group, 108 total	Max 16 weeks

*Table 3. Stretch treatment*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
While the rats are sedated (isoflurane), two types of treatments will be applied to stretch the right ankle plantar-flexors using a custom-built device. In the static stretch group, the ankle will be held at a constant angle (constant strain) and in the dynamic stretch group a constant ankle joint torque (constant stress) will be applied. Based on the ankle torque at the end range of movement of the ankle joint ( <b>measured with the same device before each stretch treatment</b> ), the magnitude of each treatment will be selected. The sham treatment group will only be sedated but shall receive no stretch treatment.	Daily for 4 weeks, max. 120 min	3 groups, 36 per group, 108 total	Max 20 weeks

*Table 4. In-vivo joint mechanical properties*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
While the rats are sedated (isoflurane), the joint mechanical properties (i.e. range of motion and torque) of the right ankle will be measured using the custom-built device described in Table 3.	Once, max. 15 min	3 groups, 36 per group, 108 total	Max 20 weeks

*Table 5. In-situ muscle mechanical properties*

<b>Procedure</b>	<b>Frequency &amp; duration</b>	<b>Groups, N per group</b>	<b>Age</b>
The muscle-tendon unit mechanical properties of the right plantar flexors will be assessed during a terminal experiment while the rats are deeply anesthetized (urethane). The muscle-tendon units of the plantar-flexors will carefully be dissected free without damaging nerves and blood vessels. Their distal tendon will be connected to a servomotor. The sciatic nerve will be stimulated with a cuff electrode to elicit muscle contractions at different lengths and velocities.	Once, max. 15 hours	3 groups, 18 per group, 54 total	Max 20 weeks



Table 6. *In-situ muscle sensory properties*

Procedure	Frequency & duration	Groups, N per group	Age
With the animal under deep anaesthesia (urethane), firing of single muscle spindles and tendon organs in response to various mechanical stimuli will be assessed. The right ankle plantar-flexors will be dissected and connected to a servomotor. The lumbar dorsal roots containing the axons of the target muscle afferents will be exposed by laminectomy.	Once, max. 15 hours	3 groups, 18 per group, 54 total	Max 20 weeks

Table 7. *Ex-vivo morphological and structural properties*

Procedure	Frequency & duration	Groups, N per group	Age
The right plantar flexors will be carefully excised while the rats are under deep anaesthesia without damaging the individual muscles and tendons for morphological analysis.	Once, max. 2 hours	3 groups, 18 per group, 54 total	Max 20 weeks

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

Prior to the randomized controlled trial, we will perform experiments to optimize the immobilization protocol (i) and the stretch treatment parameters (ii). For (i) we expect to need a maximum of **21 rats** (3 durations x (6 rats +10% for experimental failure) = 21). To optimize the stretch treatment (ii) we expect to need a maximum of **66 rats**. We will test 3 different loads for static stretch (constant strain) and 3 different loads for dynamic stretching (constant stress). For optimization (ii) a power analysis has been performed based on F-tests using the data (mean ± SD) from a study in which the ankle dorsal flexion range of motion was measured in rats after a dynamic stretch session of 30 minutes (Ishikura 2015 *J Phys Ther Sci*). To be able to detect a 5% difference with a power of 0.8 and an alpha of 0.05, 10 rats per group are needed. Thus, "6 conditions x (10 rats +10% for experimental failure) = 66 rats". By optimizing the stretch treatment we minimize the amount of groups and, hence, number of rats required for the main study.

For the RCT the power analysis has been based on a one-way ANOVA performed with data (mean and SD) from studies that measured range of motion, length-force characteristics, muscle length, sarcomere number and muscle sensor firing properties (Coutinho et al, 2004, *Braz. J. Med. Biol. Res*; Olesen et al, 2014, *J Appl Physiol*; Tinklenberg et al, 2018 *Muscle Nerve*, Vincent et al, 2017, *J Neurophysiol*), with three groups, a power of 0.8 and an alpha of 0.05. We used data of untreated and treatment groups when available and if unavailable we expected a 40% treatment effect and a 20% difference between the two different treatments. The analysis revealed the highest number of required observations (n) for the length-force characteristics: a minimum sample size of 54 (16 rats per group + 10% for experimental failure = 18 per group). Because the muscle mechanical and sensory properties cannot be assessed in the same animals, a maximal total of **108 rats** will be required.

Thus, in total a maximum of **195 rats** will be required.

## B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

### Species

For this study, we will use conventional male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), which are commercially available at recognized breeders. The animals are 10 weeks of age at the start of the study. At this age, the animals are mature and have a fully developed musculoskeletal system. We don't

expect that the minor genetic differences within the Wistar rats will be able to influence the specific outcome parameters and hence don't deem it necessary to use specific inbred strains.

### Numbers

As described above in A., the power analysis revealed that our study requires a maximum of **195** rats.

Table 8: Overview of the maximum number of animals used for optimization of and for main study (also see Figure 3).

	Groups	Number of animals per group +10%*	Total
Optimization of stretch parameters	6	11	66
Optimization of immobilization	3	7	21
RCT: Muscle mechanical properties	3	18	54
RCT: Muscle sensory properties	3	18	54
		<b>Total</b>	<b>195</b>

\* The 10% for experimental failure is based on potential losses or failure of data collection due to adverse events during surgeries and experiments, as well as on the possibility that (a part of) the data is not usable for further analysis due to small deviations in the complex surgical procedures and measurements.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. 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

-It is possible to assess tissue mechanics and sensory feedback in vitro using dissected muscle and/or tendon fascicles, but not as a complete organ in relation to the whole organism with an intact neurovascular system. There is also no replacement available to investigate the long-term adaptation of muscle and tendon tissues in response to joint immobilization, including the effects of changes of the behaviour of the animal. Note that for in-vitro experiments the tissues still need to be harvested from live animals and it has been shown that the mechanical properties of single muscle fibers are not representative for the whole muscle (Ward 2020 *Front Physiol*).

-Besides in vitro experiments, mathematical models may serve to replace in vivo experiments on live animals. However, mathematical models can only be used to study the acute effects of changes in joint position, but not to study tissue adaptation. The dataset obtained in this project may be a step towards the development of a musculoskeletal model that can simulate effects of stretching on muscle properties. This may eventually lead to replacement of animal studies.

-Obtaining accurate assessments of length-force and force-velocity characteristics, or sensory feedback of individual muscles in patients with a contracture is not possible. This would require invasive measurements than can only be applied during surgical procedures. To assess changes in muscle morphological properties, muscle tissue needs to be harvested. This requires invasive procedures that damage the muscle and may be painful. Even though muscle biopsies are performed in human subjects,

we deem these procedures not ethical for people with contractures, especially not in one of the most important indications, i.e. in children with cerebral palsy. With non-invasive methods, such as ultrasonography, changes in the length of muscle and tendon can be measured. However, with these procedures, it is not possible to assess changes in morphological, mechanical and sensory properties of the stretched muscles. In addition, the patient population is very heterogeneous and often receives different modalities of contracture treatment (i.e. surgery, medication, physiotherapy) in addition or prior to stretch treatment. Therefore, it is virtually impossible to assess the effects of the stretch treatment. Therefore, addressing our research questions will require using a homogeneous animal model so that a better understanding regarding the aforementioned topics can be obtained.

-The rat is deemed the most suitable animal model for the proposed research since it is the smallest anatomical and physiological representative animal model in which the proposed experimental procedures can be accurately performed. Our lab and also other labs over the world possess ample knowledge about this animal model and the to be studied structures and tissues.

### **Reduction**

- Before starting the experiments, rat cadavers from other experiments will be used for a detailed study of the anatomy and to practice all the surgical procedures for this project.
- Power analyses based on data of former immobilization and stretch experiments with rats have been performed to make sure that enough animals will be used for the primary outcome parameters and that no unnecessarily high numbers of animals will be killed.
- All the animals will be sheltered, fed and cared for with standardized methods by experience personnel to limit inter-subject variability.
- Prior to the stretch treatment study, we will perform experiments to optimize the duration of the immobilization protocol and the stretch treatment parameters. This will help us to select the most useful conditions for the main study, thereby, reducing the sample size.
- Much is already known about this animal model (*Rattus norvegicus albinus*), so basic properties do not have to be investigated anymore. Also, there is ample experience with both in situ and in vivo experimental procedures using this species in our laboratory.
- Multiple measurements will be performed on a single animal without increasing their suffering to optimize their usefulness and reduce the number of necessary animals.
- Not all animals will enter the experimental timeline simultaneously. This allows us to monitor the acquired power using the standard deviation of the actual experimental groups and stop with including more animals if the power has been achieved.

### **Refinement**

- A rat model is chosen because muscle tissue properties and structure are comparable to those of humans. Also, our lab has ample experience with the proposed procedures and the appropriate infrastructure for this model.
- The method of immobilization to induce a joint contracture is tolerated very well by the animals, in contrast to classical approaches such as plaster casting. Because the animals will not try to remove the "cast" by gnawing and biting, there is no need for extra anaesthesia and analgesia and procedures to replace it except for during the surgery. Thus, this method of immobilization diminishes the frequency of stressful situations and, thus, will involve less animal suffering.
- We will use advanced and refined techniques and equipment to measure the mechanical and sensory outcome parameters that will deliver very consistent data with the minimal amount of suffering possible (terminal anaesthesia).
- The parameters (i.e. magnitude) for the stretching protocols will be optimized prior to the main experiment. This reduces the amount of treatment groups and, thus, the total amount of animals that will undergo the moderate suffering associated with the main study.
- All surgical procedures will be practised and refined on cadavers before any surgery is performed on live animals.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

- The animals will be controlled daily by qualified caretakers, technical staff and/or researchers.
- The animals will be weighed regularly to control that they eat enough.
- The sutured wounds will be inspected daily for possible adverse developments (e.g. infection).
- Anaesthesia, analgesia and sedation will be applied where necessary to limit suffering, pain and fear.
- During surgery the body temperature will be maintained at 37°C with a heating pad.
- Animals will be housed in pairs.
- The animals will be monitored carefully during all procedures.
- Enrichments will be added to their cages to improve the animals their wellbeing.
- The animals will be handled frequently for this research, to minimize the stress caused by the frequent handling of the animals. All experiments will be performed under supervision of a trained researcher and the animals will be gradually exposed to the researchers that perform the procedures to get used to them.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Literature searches have been performed in multiple databases to define the study aims, methods and outcome parameters. We have not encountered any studies describing the experiments proposed and are not aware based on our scientific contacts that these experiments are planned elsewhere.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### **G. 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 H.

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.

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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.

Anaesthetics and (largely perioperatively) analgesics will be used during the immobilization and relieve surgeries, as well as during the terminal muscle mechanics and sensory feedback experiments.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

Possibly, the wounds of the surgeries for joint immobilization and release may be infected, but this is very rarely observed (<3%).

Explain why these effects may emerge.

The surgeries will be performed under aseptic conditions, but in the exceptional case (<3%) that bacteria are present an infection may develop. If detected the infection will be treated with antibiotics so that the experiment can be completed.

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

The rats will be monitored on a regular basis and inspected closely after the surgery to ensure their wound recovery, health and welfare. Their wounds will be treated with a combination of betadine and prontosan or with Hibicet after every surgery to diminish the risk of infection. In case of an infection the wound will be treated and appropriate medication (advised by the veterinarian) will be administered.

### **J. 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 K.

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

Other than adverse reactions caused by the survival surgeries are not expected. In case other adverse events occur, the following humane endpoints will be applied: Weight loss of  $\geq 20\%$  of the maximum weight or of  $\geq 15\%$  in 2 days. Other observations which are signs of suffering and pain such as abnormal posture unrelated to the intervention (crouched back), substantially reduced activity, signs of compromised health (bad fur, hair loss, diarrhea) or persistent infection.

Indicate the likely incidence.

There is a very low chance (<1%) that the animals will show these signs. In the past >10 years in which similar procedures have been performed in many animals (>100), only in one case the experiment was terminated due to a humane endpoint.

### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Table 9. depicts the different procedures and the associated level of discomfort and the percentage of the animals that will undergo this amount of discomfort.

Table 9.

Procedure	Level of discomfort	Percentage of animals
Surgery for immobilization of ankle joint	Moderate	66% (11% optimization i, 55% RCT)

Period of joint immobilization	Moderate	66% (11% optimization i, 55% RCT)
Surgery to release immobilization	Moderate	66% (11% optimization i, 55% RCT)
Stretch treatment	Moderate	55% (RCT)
In vivo joint mechanical properties	Moderate	66% (11% optimization i, 55% RCT)
In situ muscle mechanical and sensory properties	Mild	66% (11% optimization i, 55% RCT)
In situ muscle mechanical properties (optimization ii)	Non-recovery	34% (optimization ii)

The cumulative discomfort of the animals will be maximally moderate for 66% and non-recovery for the other 34%.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

After the stretching intervention, terminal measurements will be performed to assess the effects on the mechanical and sensory muscles properties. Subsequently, muscle and tendon tissues will be harvested for histological and biochemical analysis, and the animals will be terminated.

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

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

Yes



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het effect van rekken op gewrichts- en spiereigenschappen bij een dwangstand van een gewricht
1.2 Looptijd van het project	4 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Rekken, spierverskorting, gewrichtsmobiliteit, peesverkorting, spierstijfheid

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Wanneer een gewricht langdurig in een bepaalde stand blijft staan, kan er een verkorting van de spieren en pezen ontstaan. Hierdoor kan een gewricht in een dwangstand komen, dit heet een contractuur. Spieren en pezen kunnen verkorten bij een dergelijke dwangstand dat zorgt voor een verminderde bewegelijkheid en verhoogde stijfheid van gewrichten. De bewegelijkheid van een gewricht kan zo verminderd zijn dat patiënten moeite kunnen hebben met veel dagelijkse activiteiten, zoals lopen of aankleden. Contracturen komen bij veel verschillende ziektebeelden voor waarbij het zenuwstelsel en/of het spier-skeletstelsel aangedaan is, zoals bijvoorbeeld na een beroerte of na het zetten van een kunstknie. Bij veel patiënten met een
---	---

contractuur wordt therapie gegeven in de vorm van rekbehandelingen. Het doel hiervan is de verkorte spieren en pezen weer langer te maken.

Er zijn verschillende vormen van rekken. Er kan bijvoorbeeld gerekt worden door met veel kracht het gewricht naar de eindstand te brengen en vervolgens het gewricht vast te zetten met bijvoorbeeld gips. Er kan ook gerekt worden door een constante lichte kracht uit te oefenen op het gewricht door middel van een spalk met een veer. Beide manieren worden regelmatig toegepast, maar het is niet bekend welke van deze twee manieren het beste resultaat geeft. Ook is niet bekend met hoeveel kracht, hoe lang en hoe vaak er het beste gerekt kan worden, en wat het effect is van deze verschillende rekmethoden op spierfunctie. In dit project bestuderen we hoe spier- en peesweefsel zich aanpast bij verschillende rekbehandelingen na het opleggen van een contractuur.

We zullen dit onderzoeken door eerst een contractuur te veroorzaken in het enkelgewricht van een rat. Daarna krijgen de ratten dagelijks voor 4 weken 2 uur per dag verschillende rekbehandelingen of een placebo behandeling. Hierna wordt bij de ratten onder algehele narcose de eindstand van het gewricht, de spier(vezel)- en peeslengte, de spierkracht en zintuiglijke functie gemeten. Nadat de spieren uit het dier zijn gehaald wordt het dier gedood met een overdosis van het narcosemiddel.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Met deze studie wordt er meer kennis vergaard over de manier waarop pezen en skeletspieren en de signalen die ze versturen zich aanpassen wanneer ze worden blootgesteld aan rek als er sprake is van een contractuur. Het voorgestelde diermodel geeft de mogelijkheid tot een gedetailleerde studie waarin niet alleen de gevolgen voor de eigenschappen van het gewricht bepaald kunnen worden, maar ook die van de spieren en pezen. De uitkomsten van dit onderzoek zullen een beter beeld geven van het type behandeling waarmee de beste resultaten worden behaald.

Contracturen komen voor bij veel verschillende aandoeningen van neurologische aard en van het spierskeletstelsel. Zo komen contracturen in 80% van in het ziekenhuis opgenomen patiënten met hersenletsel voor. Op dit moment is niet duidelijk welke methode van rekken het beste resultaat geeft en waarom. Zo wordt nu de opgelegde kracht en de methode van de rek behandeling gebaseerd op de voorkeur van de behandelaar en de verdraagzaamheid jegens rek van de patiënt in plaats van wat het beste resultaat biedt voor de gewrichten en spieren. Een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen helpt de behandelaar bij het kiezen van de beste behandelmethode voor de patiënt. De uitkomsten uit deze studie zullen gebruikt worden om de variabelen te optimaliseren in een humane studie.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Maximaal 195 ratten zullen worden gebruikt.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De meerderheid van de dieren (66%) zal matig ongerief ervaren veroorzaakt door de contractuuroperatie en de rekbehandeling. De ingrepen zijn klein en van korte duur, en naderhand kan de rat met rust gelaten worden. Licht ongerief wordt veroorzaakt door de verdoving die wordt gegeven voor de terminale meting waarna het dier wordt dood gemaakt. Een deel van de dieren (34%) ondergaat alleen terminaal ongerief als gevolg van het doden onder anesthesie.



- |   |   |
|---|---|
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Het ongerief is matig bij 66% procent van de dieren en het ongerief is terminaal bij de overige 34%. Alle dieren worden na de handeling onder volledige narcose gedood. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?                               | De dieren worden na afloop van de experimenten gedood, waarna weefsel wordt gebruikt voor onderzoek.  |

## 4 Drie V's

- |   |  |
|---|--|
| <p>4.1 <b>Vervanging</b><br/>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdierlijke alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>    | <p>Dit onderzoek moet bij dieren worden uitgevoerd om het proces van weefsel aanpassing bij rekken te kunnen nabootsen en de eigenschappen van de betrokken weefsels gedetailleerd te kunnen onderzoeken. Dit kan niet met celkweek, omdat het niet mogelijk is om hele spieren te kweken en langdurig in leven te houden. Ook de spierweefselmonsters (biopten) die bij mensen kunnen worden afgenomen zijn te klein. Er zijn wiskundige modellen ontworpen die spier en pees gedrag kunnen nabootsen, maar er zijn geen modellen waarmee veranderingen in dat weefsel gesimuleerd kunnen worden.</p>   |
| <p>4.2 <b>Vermindering</b><br/>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>  | <p>Het onderzoek wordt uitgevoerd met behulp van 'standard operating procedures' om variatie tussen individuele experimenten te voorkomen. Doormiddel van een statistische analyse en gefaseerde opzet wordt gewaarborgd dat het optimale aantal dieren wordt gebruikt. Het aantal dieren wordt verder beperkt door alle procedures eerst uitvoerig te oefenen op dode dieren uit andere studies. Ook worden de kracht en duur van de rekbehandeling geoptimaliseerd om het aantal behandelgroepen laag te houden. Er worden meerdere metingen uitgevoerd op één dier.</p>   |
| <p>4.3 <b>Verfijning</b><br/>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p> | <p>Er is veel ervaring met de voorgestelde procedures en het proefdiermodel in ons laboratorium. Muizen zijn te klein voor het goed uitvoeren van de experimentele procedures. Het spierweefsel en de bouw van de skeletspieren van de rat zijn voor het grootste deel vergelijkbaar met die van de mens. Ook zijn de fysiologische mechanismen die betrokken zijn bij de aanpassingen van spieren en pezen door rek hetzelfde.</p>  |
| <p>Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.</p>                      | <p>Alle handelingen zullen worden uitgevoerd door gekwalificeerd personeel met veel ervaring in de specifieke handelingen. Bij de operaties wordt algehele anesthesie en effectieve pijnbestrijding toegepast. Alle dieren worden continu gemonitord op een aantal belangrijke kenmerken, waaronder welzijn, om het ongerief bij de dieren zoveel mogelijk te kunnen beperken. Bij hoger ongerief dan verwacht worden de humane eindpunten toegepast. De rek behandeling wordt toegepast terwijl de ratten licht verdoofd zijn zodat ze niet merken dat ze vast zitten en zo min mogelijk ongerief ervaren (matig ongerief). Vooraf worden de verschillende rek protocollen verfijnd in optimalisatie protocollen. Hierdoor zullen minder verschillende rek-behandelingen getest hoeven te worden.</p> |

---

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen




## Advies aan CCD

Datum 17 mei 2021  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114471

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures  
 Aanvraagnummer: AVD202114471  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Translationeel of toegepast onderzoek

### 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<b>Proces</b>	Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC en aan de aanvrager.  <sup>1</sup>			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Wistar	195	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

### 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit.  Vraag DEC vervanging, citaat: De DEC vraagt zich af of een deel van deze proeven niet in humane patiënten kan worden uitgevoerd? Waarom is deze vergelijking van behandelingen niet mogelijk in de patiënten? De
-------------------	--

# Overzicht van opmerkingen bij 10. Adviesnota CCD, d.d. 17-5-2021 \_met opmerkingen.pdf

---

Pagina: 1

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 18-5-2021 10:48:33

Zou voor deze aanvraag niet een nieuw format NTS ingediend moeten zijn? Is natuurlijk een dingetje voor het secretariaat, maar ik weet niet in hoeverre dit wettelijk verplicht is.

DEC ziet hier graag meer argumenten voor de noodzaak van het onderzoek in dieren, waarom is er geen vervanging (in vitro of in de humane patiënt) mogelijk?

Antwoord aanvrager vervanging, citaat: Met echografie kan de globale architectuur van spieren (spierbundellengte en hoek) benaderd worden, maar voor dit project is het noodzakelijk om de structuur op microscopisch niveau te onderzoeken. Daarnaast is het voor het beantwoorden van onze onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor een dergelijke meting dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopt zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is. In de revisie zijn deze argumenten toegevoegd aan 3.1 en de 3V's (Vervanging).

Citaat C14: Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor dergelijke metingen dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopt zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is.

De keuze voor het gebruik van ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De rat is het kleinste representatieve diermodel

(anatomisch en fysiologisch), waarin de voorgestelde procedures kunnen worden uitgevoerd. Er is een grote hoeveelheid kennis aanwezig over dit diermodel en de te onderzoeken structuren en weefsels. Het spierweefsel en de bouw van de skeletspieren van de rat zijn voor het grootste deel vergelijkbaar met die van de mens.

Citaat C18: Na vragen vanuit de DEC hebben de onderzoekers besloten beide geslachten te gebruiken, dus zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de effecten van twee verschillende rekbehandelingen (statische en dynamische) op de mechanische, sensorische en morfologische eigenschappen van het bewegingsapparaat bij een contractuur (van het enkelgewricht) het gebruik van maximaal 195 ratten die hiervan terminaal tot matig ongerief ondervinden?

2. De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast, een deel van de dieren ondervindt maximaal terminaal ongerief (34%) en een deel ondervindt maximaal matig ongerief (66%). Dit zorgt voor veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de onderliggende mechanismen, het sensorisch gedrag en aanpassingsvermogen van skeletspieren in reactie op verschillende rekbehandelingen bij een gewrichtscontractuur. De waarde voor de patiënten is: de optimalisatie van rekbehandelingen, een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen helpt de behandelaar bij het kiezen van de beste behandelingsmethode voor de patiënt. De uitkomsten uit deze studie zullen gebruikt worden om de variabelen te optimaliseren in een humane studie. De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de maximaal 195 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden.

3. Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is om meer kennis te verkrijgen over de manier waarop pezen en skeletspieren en de signalen die ze versturen zich aanpassen wanneer ze worden blootgesteld aan rek als er sprake is van een contractuur. Het verwachte resultaat, in het kader van het optimaliseren van rekbehandelingen in patiënten is afgewogen tegen het, terminaal tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de

proef.

Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Zowel het wetenschappelijk belang als het maatschappelijk belang zijn substantieel. Het maatschappelijk belang is groot, het is op dit moment niet duidelijk welke rekbehandeling het beste resultaat geeft en waarom. De uitkomsten van dit onderzoek zullen een beter beeld geven van het type behandeling waarmee de beste resultaten worden behaald. Het wetenschappelijk belang is ook groot, het voorgestelde diermodel geeft de mogelijkheid tot een gedetailleerde studie waarin niet alleen de gevolgen voor de eigenschappen van het gewricht bepaald kunnen worden, maar ook die van de spieren en pezen.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over genoeg ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Concluderend: Het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek weegt naar het oordeel van de DEC op tegen het gebruik van maximaal 195 ratten, en het daarbij verwachte terminale tot matige ongerief.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: De meerderheid adviseert positief omdat het unilateraal rekken goed is onderbouwd als ook het gebruik van het aantal dieren en de keuze voor mannetjes. Het uitvoeren van deze experimenten bij

patiënten is lastig i.v.m. met de grote variatie in de mate van contractuur en historie van behandeling van de patiënten. Daarbij speelt dat patiënten voetvervormingen laten zien hetgeen een gecontroleerde belasting op de kuitspieren bemoeilijkt. Het gaat om de onderliggende mechanismen waarvoor read-outs nodig zijn die niet in de mens kunnen worden gebruikt. Met de variatie in patiënten door grote verschillen in de mate en aard van contractuur is een systematische vergelijking van behandelingen in patiënten nagenoeg niet mogelijk. De gesignaleerde mogelijke translatie-issues van rat naar mens zijn in dit project niet bijzonder anders dan bij andere diermodellen; verder is er al veel onderzoek met vergelijkbare modellen gedaan. Het enige punt van zorg is dat er onder algehele anesthesie gerekt wordt. Er zijn aanwijzingen in de literatuur dat spieractiviteit, hetzij vrijwillig of door rekreflex/fibrillaties, nodig is om lengteadaptaties te induceren. De vraag is of onder algehele anesthesie activatie door het triggeren van de rekreflex of door fibrillatie kan plaatsvinden? Dat antwoord is nu niet te geven. Voorgestelde experimenten zullen dan ook uitwijzen of er enig effect is van de rekbehandelingen onder gegeven condities. Onze expert verwacht dat daarmee de studie sowieso relevante kennis opleveren voor het behandelen van gewrichtscontracturen. De meerwaarde is voor de meerderheid voldoende duidelijk en weegt voldoende op tegen het ongerief van de 195 dieren; het cumulatieve ongerief, matig voor de meeste dieren, is correct ingeschat en komt niet in de buurt van wat je ernstig ongerief zou kunnen noemen. Proefopzet deugt en de doelstelling is haalbaar. Vandaar positief advies.

Eén lid kan zich hierin niet vinden, omdat de vraag blijft of het noodzakelijk is om de onderliggende mechanismen te onderzoeken voor het verbeteren van de rekprotocollen. Dit lid is van mening dat het ook mogelijk is om dit soort onderzoek naar rekprotocollen zonder proefdieren te doen. Het vergelijken van behandelprotocollen kan in principe ook bij patiënten gedaan worden. Uiteraard kan het zijn dat er door dit onderzoek een betere wetenschappelijke basis onder de behandeladviezen wordt gelegd. Maar dan blijft de vraag of dit opweegt tegen het doen van dierproeven omdat het doel (betere behandelprotocollen) ook anders kan worden bereikt.



### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt wel/niet op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.
U geeft in uw advies aan dat dit advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. De CCD waardeert het dat de discussie waarom de beslissing niet unaniem is gemaakt, helder in uw advies verwoord is. Het is goed navolgbaar voor de CCD hoe de discussie binnen de DEC verlopen is.

### 4 Inhoudelijke beoordeling

#### 3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model</b>		
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 34,0% Terminaal 66,0% Matig	

### 5 Samenvatting

#### 5.2 lid1

Het advies van de DEC is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. 1 lid van

de DEC vindt onvoldoende onderbouwd waarom het onderzoek niet in mensen kan worden uitgevoerd. Dit lid geeft aan dat met dit onderzoek een betere wetenschappelijke basis onder de behandeladviezen wordt gelegd. Maar het blijft voor dit lid dan de vraag of dit opweegt tegen het doen van dierproeven omdat het doel (betere behandelprotocollen) ook anders kan worden bereikt. Na een uitgebreid antwoord van de aanvrager op de vraag vanuit de DEC wat de noodzaak is om het onderzoek in dieren uit te voeren, is de meerderheid van de DEC overtuigd dat het onderzoek in dieren noodzakelijk is. Daarbij geeft de aanvrager aan dat de effecten van de contractuur en de rekbehandeling op het lopen of andere motorische taken niet zullen worden onderzocht in deze projectaanvraag. Wanneer er mechanismen van verschillende rekmethodes beter begrepen worden, zullen deze vervolgens verder worden onderzocht bij patiënten met een contractuur, en dus niet in proefdieren. Na de beantwoording van de vragen van de DEC over vervanging

5.2 lid1

#### **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

#### **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



# Advies aan CCD

Datum 18 mei 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114471

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures  
 Aanvraagnummer: AVD202114471  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<b>Proces</b>	Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC en aan de aanvrager.			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Wistar	195	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit.  Vraag DEC vervanging, citaat: De DEC vraagt zich af of een deel van deze proeven niet in humane patiënten kan worden uitgevoerd? Waarom is deze vergelijking van behandelingen niet mogelijk in de patiënten? De
-------------------	--

DEC ziet hier graag meer argumenten voor de noodzaak van het onderzoek in dieren, waarom is er geen vervanging (in vitro of in de humane patiënt) mogelijk?

Antwoord aanvrager vervanging, citaat: Met echografie kan de globale architectuur van spieren (spierbundellengte en hoek) benaderd worden, maar voor dit project is het noodzakelijk om de structuur op microscopisch niveau te onderzoeken. Daarnaast is het voor het beantwoorden van onze onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor een dergelijke meting dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopt zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is. In de revisie zijn deze argumenten toegevoegd aan 3.1 en de 3V's (Vervanging).

Citaat C14: Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor dergelijke metingen dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopt zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is.

De keuze voor het gebruik van ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De rat is het kleinste representatieve diermodel

(anatomisch en fysiologisch), waarin de voorgestelde procedures kunnen worden uitgevoerd. Er is een grote hoeveelheid kennis aanwezig over dit diermodel en de te onderzoeken structuren en weefsels. Het spierweefsel en de bouw van de skeletspieren van de rat zijn voor het grootste deel vergelijkbaar met die van de mens.

Citaat C18: Na vragen vanuit de DEC hebben de onderzoekers besloten beide geslachten te gebruiken, dus zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de effecten van twee verschillende rekbehandelingen (statische en dynamische) op de mechanische, sensorische en morfologische eigenschappen van het bewegingsapparaat bij een contractuur (van het enkelgewricht) het gebruik van maximaal 195 ratten die hiervan terminaal tot matig ongerief ondervinden?

2. De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast, een deel van de dieren ondervindt maximaal terminaal ongerief (34%) en een deel ondervindt maximaal matig ongerief (66%). Dit zorgt voor veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de onderliggende mechanismen, het sensorisch gedrag en aanpassingsvermogen van skeletspieren in reactie op verschillende rekbehandelingen bij een gewrichtscontractuur. De waarde voor de patiënten is: de optimalisatie van rekbehandelingen, een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen helpt de behandelaar bij het kiezen van de beste behandelmethode voor de patiënt. De uitkomsten uit deze studie zullen gebruikt worden om de variabelen te optimaliseren in een humane studie. De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de maximaal 195 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden.

3. Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is om meer kennis te verkrijgen over de manier waarop pezen en skeletspieren en de signalen die ze versturen zich aanpassen wanneer ze worden blootgesteld aan rek als er sprake is van een contractuur. Het verwachte resultaat, in het kader van het optimaliseren van rekbehandelingen in patiënten is afgewogen tegen het, terminaal tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de

proef.

Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Zowel het wetenschappelijk belang als het maatschappelijk belang zijn substantieel. Het maatschappelijk belang is groot, het is op dit moment niet duidelijk welke rekbehandeling het beste resultaat geeft en waarom. De uitkomsten van dit onderzoek zullen een beter beeld geven van het type behandeling waarmee de beste resultaten worden behaald. Het wetenschappelijk belang is ook groot, het voorgestelde diermodel geeft de mogelijkheid tot een gedetailleerde studie waarin niet alleen de gevolgen voor de eigenschappen van het gewricht bepaald kunnen worden, maar ook die van de spieren en pezen.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over genoeg ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Concluderend: Het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek weegt naar het oordeel van de DEC op tegen het gebruik van maximaal 195 ratten, en het daarbij verwachte terminale tot matige ongerief.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: De meerderheid adviseert positief omdat het unilateraal rekken goed is onderbouwd als ook het gebruik van het aantal dieren en de keuze voor mannetjes. Het uitvoeren van deze experimenten bij

patiënten is lastig i.v.m. met de grote variatie in de mate van contractuur en historie van behandeling van de patiënten. Daarbij speelt dat patiënten voetvervormingen laten zien hetgeen een gecontroleerde belasting op de kuitspieren bemoeilijkt. Het gaat om de onderliggende mechanismen waarvoor read-outs nodig zijn die niet in de mens kunnen worden gebruikt. Met de variatie in patiënten door grote verschillen in de mate en aard van contractuur is een systematische vergelijking van behandelingen in patiënten nagenoeg niet mogelijk. De gesignaleerde mogelijke translatie-issues van rat naar mens zijn in dit project niet bijzonder anders dan bij andere diermodellen; verder is er al veel onderzoek met vergelijkbare modellen gedaan. Het enige punt van zorg is dat er onder algehele anesthesie gerekt wordt. Er zijn aanwijzingen in de literatuur dat spieractiviteit, hetzij vrijwillig of door rekreflex/fibrillaties, nodig is om lengteadaptaties te induceren. De vraag is of onder algehele anesthesie activatie door het triggeren van de rekreflex of door fibrillatie kan plaatsvinden? Dat antwoord is nu niet te geven. Voorgestelde experimenten zullen dan ook uitwijzen of er enig effect is van de rekbehandelingen onder gegeven condities. Onze expert verwacht dat daarmee de studie sowieso relevante kennis opleveren voor het behandelen van gewrichtscontracturen. De meerwaarde is voor de meerderheid voldoende duidelijk en weegt voldoende op tegen het ongerief van de 195 dieren; het cumulatieve ongerief, matig voor de meeste dieren, is correct ingeschat en komt niet in de buurt van wat je ernstig ongerief zou kunnen noemen. Proefopzet deugt en de doelstelling is haalbaar. Vandaar positief advies.

Eén lid kan zich hierin niet vinden, omdat de vraag blijft of het noodzakelijk is om de onderliggende mechanismen te onderzoeken voor het verbeteren van de rekprotocollen. Dit lid is van mening dat het ook mogelijk is om dit soort onderzoek naar rekprotocollen zonder proefdieren te doen. Het vergelijken van behandelprotocollen kan in principe ook bij patiënten gedaan worden. Uiteraard kan het zijn dat er door dit onderzoek een betere wetenschappelijke basis onder de behandeladviezen wordt gelegd. Maar dan blijft de vraag of dit opweegt tegen het doen van dierproeven omdat het doel (betere behandelprotocollen) ook anders kan worden bereikt.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt wel/niet op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.
U geeft in uw advies aan dat dit advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. De CCD waardeert het dat de discussie waarom de beslissing niet unaniem is gemaakt, helder in uw advies verwoord is. Het is goed navolgbaar voor de CCD hoe de discussie binnen de DEC verlopen is.

### 4 Inhoudelijke beoordeling

#### 3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model</b>		
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 34,0% Terminaal 66,0% Matig	

### 5 Samenvatting

#### 5.2 lid1

Het advies van de DEC is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. 1 lid van



de DEC vindt onvoldoende onderbouwd waarom het onderzoek niet in mensen kan worden uitgevoerd. Dit lid geeft aan dat met dit onderzoek een betere wetenschappelijke basis onder de behandeladviezen wordt gelegd. Maar het blijft voor dit lid dan de vraag of dit opweegt tegen het doen van dierproeven omdat het doel (betere behandelprotocollen) ook anders kan worden bereikt. Na een uitgebreid antwoord van de aanvrager op de vraag vanuit de DEC wat de noodzaak is om het onderzoek in dieren uit te voeren, is de meerderheid van de DEC overtuigd dat het onderzoek in dieren noodzakelijk is. Daarbij geeft de aanvrager aan dat de effecten van de contractuur en de rekbehandeling op het lopen of andere motorische taken niet zullen worden onderzocht in deze projectaanvraag. Wanneer er mechanismen van verschillende rekmethodes beter begrepen worden, zullen deze vervolgens verder worden onderzocht bij patiënten met een contractuur, en dus niet in proefdieren. Na de beantwoording van de vragen van de DEC over vervanging

5.2 lid1

[Redacted text]

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

[Redacted text]

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



# Advies aan CCD

Datum 31 mei 2021  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114471

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures  
 Aanvraagnummer: AVD202114471  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<b>Proces</b>	Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC en aan de aanvrager.			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Wistar	195	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit.  Vraag DEC vervanging, citaat: De DEC vraagt zich af of een deel van deze proeven niet in humane patiënten kan worden uitgevoerd? Waarom is deze vergelijking van behandelingen niet mogelijk in de patiënten? De
-------------------	--

DEC ziet hier graag meer argumenten voor de noodzaak van het onderzoek in dieren, waarom is er geen vervanging (in vitro of in de humane patiënt) mogelijk?

Antwoord aanvrager vervanging, citaat: Met echografie kan de globale architectuur van spieren (spierbundellengte en hoek) benaderd worden, maar voor dit project is het noodzakelijk om de structuur op microscopisch niveau te onderzoeken. Daarnaast is het voor het beantwoorden van onze onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor een dergelijke meting dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopt zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is. In de revisie zijn deze argumenten toegevoegd aan 3.1 en de 3V's (Vervanging).

Citaat C14: Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen van essentieel belang ook de mechanische en sensorische eigenschappen van individuele spieren te bepalen. Voor dergelijke metingen dienen de pezen losgemaakt te worden van het skelet, iets dat bij patiënten in vivo niet mogelijk is. In vitro onderzoek met spierweefsel uit een biopt zou gebruikt kunnen worden om de effecten van rekken op spiervezelniveau te onderzoeken. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de mechanische eigenschappen van enkele spiervezels niet gebruikt kunnen worden om deze eigenschappen op spierniveau te schatten. Daarbij ontvangen patiënten naast een rekbehandeling nog andere behandelingen (operaties, medicijnen, fysiotherapie), waardoor het zuivere effect van enkel de rekbehandeling niet te bepalen is.

De keuze voor het gebruik van ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De rat is het kleinste representatieve diermodel

(anatomisch en fysiologisch), waarin de voorgestelde procedures kunnen worden uitgevoerd. Er is een grote hoeveelheid kennis aanwezig over dit diermodel en de te onderzoeken structuren en weefsels. Het spierweefsel en de bouw van de skeletspieren van de rat zijn voor het grootste deel vergelijkbaar met die van de mens.

Citaat C18: Na vragen vanuit de DEC hebben de onderzoekers besloten beide geslachten te gebruiken, dus zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de effecten van twee verschillende rekbehandelingen (statische en dynamische) op de mechanische, sensorische en morfologische eigenschappen van het bewegingsapparaat bij een contractuur (van het enkelgewricht) het gebruik van maximaal 195 ratten die hiervan terminaal tot matig ongerief ondervinden?

2. De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast, een deel van de dieren ondervindt maximaal terminaal ongerief (34%) en een deel ondervindt maximaal matig ongerief (66%). Dit zorgt voor veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de onderliggende mechanismen, het sensorisch gedrag en aanpassingsvermogen van skeletspieren in reactie op verschillende rekbehandelingen bij een gewrichtscontractuur. De waarde voor de patiënten is: de optimalisatie van rekbehandelingen, een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen helpt de behandelaar bij het kiezen van de beste behandelmethode voor de patiënt. De uitkomsten uit deze studie zullen gebruikt worden om de variabelen te optimaliseren in een humane studie. De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de maximaal 195 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden.

3. Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is om meer kennis te verkrijgen over de manier waarop pezen en skeletspieren en de signalen die ze versturen zich aanpassen wanneer ze worden blootgesteld aan rek als er sprake is van een contractuur. Het verwachte resultaat, in het kader van het optimaliseren van rekbehandelingen in patiënten is afgewogen tegen het, terminaal tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de

proef.

Er is discussie binnen de DEC over of de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald. De meerderheid van de leden acht het gebruik van de dieren, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Zowel het wetenschappelijk belang als het maatschappelijk belang zijn substantieel. Het maatschappelijk belang is groot, het is op dit moment niet duidelijk welke rekbehandeling het beste resultaat geeft en waarom. De uitkomsten van dit onderzoek zullen een beter beeld geven van het type behandeling waarmee de beste resultaten worden behaald. Het wetenschappelijk belang is ook groot, het voorgestelde diermodel geeft de mogelijkheid tot een gedetailleerde studie waarin niet alleen de gevolgen voor de eigenschappen van het gewricht bepaald kunnen worden, maar ook die van de spieren en pezen.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over genoeg ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Concluderend: Het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek weegt naar het oordeel van de DEC op tegen het gebruik van maximaal 195 ratten, en het daarbij verwachte terminale tot matige ongerief.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: De meerderheid adviseert positief omdat het unilateraal rekken goed is onderbouwd als ook het gebruik van het aantal dieren en de keuze voor mannetjes. Het uitvoeren van deze experimenten bij

patiënten is lastig i.v.m. met de grote variatie in de mate van contractuur en historie van behandeling van de patiënten. Daarbij speelt dat patiënten voetvervormingen laten zien hetgeen een gecontroleerde belasting op de kuitspieren bemoeilijkt. Het gaat om de onderliggende mechanismen waarvoor read-outs nodig zijn die niet in de mens kunnen worden gebruikt. Met de variatie in patiënten door grote verschillen in de mate en aard van contractuur is een systematische vergelijking van behandelingen in patiënten nagenoeg niet mogelijk. De gesignaleerde mogelijke translatie-issues van rat naar mens zijn in dit project niet bijzonder anders dan bij andere diermodellen; verder is er al veel onderzoek met vergelijkbare modellen gedaan. Het enige punt van zorg is dat er onder algehele anesthesie gerekt wordt. Er zijn aanwijzingen in de literatuur dat spieractiviteit, hetzij vrijwillig of door rekreflex/fibrillaties, nodig is om lengteadaptaties te induceren. De vraag is of onder algehele anesthesie activatie door het triggeren van de rekreflex of door fibrillatie kan plaatsvinden? Dat antwoord is nu niet te geven. Voorgestelde experimenten zullen dan ook uitwijzen of er enig effect is van de rekbehandelingen onder gegeven condities. Onze expert verwacht dat daarmee de studie sowieso relevante kennis opleveren voor het behandelen van gewrichtscontracturen. De meerwaarde is voor de meerderheid voldoende duidelijk en weegt voldoende op tegen het ongerief van de 195 dieren; het cumulatieve ongerief, matig voor de meeste dieren, is correct ingeschat en komt niet in de buurt van wat je ernstig ongerief zou kunnen noemen. Proefopzet deugt en de doelstelling is haalbaar. Vandaar positief advies.

Eén lid kan zich hierin niet vinden, omdat de vraag blijft of het noodzakelijk is om de onderliggende mechanismen te onderzoeken voor het verbeteren van de rekprotocollen. Dit lid is van mening dat het ook mogelijk is om dit soort onderzoek naar rekprotocollen zonder proefdieren te doen. Het vergelijken van behandelprotocollen kan in principe ook bij patiënten gedaan worden. Uiteraard kan het zijn dat er door dit onderzoek een betere wetenschappelijke basis onder de behandeladviezen wordt gelegd. Maar dan blijft de vraag of dit opweegt tegen het doen van dierproeven omdat het doel (betere behandelprotocollen) ook anders kan worden bereikt.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt wel/niet op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.
U geeft in uw advies aan dat dit advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. De CCD waardeert het dat de discussie waarom de beslissing niet unaniem is gemaakt, helder in uw advies verwoord is. Het is goed navolgbaar voor de CCD hoe de discussie binnen de DEC verlopen is.

### 4 Inhoudelijke beoordeling

#### 3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model</b>		
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 34,0% Terminaal 66,0% Matig	

### 5 Samenvatting

#### 5.2 lid1

Het advies van de DEC is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. 1 lid van

de DEC vindt onvoldoende onderbouwd waarom het onderzoek niet in mensen kan worden uitgevoerd. Dit lid geeft aan dat met dit onderzoek een betere wetenschappelijke basis onder de behandeladviezen wordt gelegd. Maar het blijft voor dit lid dan de vraag of dit opweegt tegen het doen van dierproeven omdat het doel (betere behandelprotocollen) ook anders kan worden bereikt. Na een uitgebreid antwoord van de aanvrager op de vraag vanuit de DEC wat de noodzaak is om het onderzoek in dieren uit te voeren, is de meerderheid van de DEC overtuigd dat het onderzoek in dieren noodzakelijk is. Daarbij geeft de aanvrager aan dat de effecten van de contractuur en de rekbehandeling op het lopen of andere motorische taken niet zullen worden onderzocht in deze projectaanvraag. Wanneer er mechanismen van verschillende rekmethodes beter begrepen worden, zullen deze vervolgens verder worden onderzocht bij patiënten met een contractuur, en dus niet in proefdieren. Na de beantwoording van de vragen van de DEC over vervanging

5.2 lid1

[Redacted text]

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

[Redacted text]

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**





## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project    | Het effect van rekken op gewrichts- en spiereigenschappen bij een dwangstand van een gewricht |
| 1.2 Looptijd van het project | 4 jaar  |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Rekken, spierverskorting, gewrichtsmobiliteit, peesverkorting, spierstijfheid                 |

### 2 Categorie van het project

- |  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.<br><br><i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

### 3 Projectbeschrijving

- |   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Wanneer een gewricht langdurig in een bepaalde stand blijft staan, kan er een verkorting van de spieren en pezen ontstaan. Hierdoor kan een gewricht in een dwangstand komen, dit heet een contractuur. Spieren en pezen kunnen verkorten bij een dergelijke dwangstand dat zorgt voor een verminderde bewegelijkheid en verhoogde stijfheid van gewrichten. De bewegelijkheid van een gewricht kan zo verminderd zijn dat patiënten moeite kunnen hebben met veel dagelijkse activiteiten, zoals lopen of aankleden. Contracturen komen bij veel verschillende ziektebeelden voor waarbij het zenuwstelsel en/of het spier-skeletstelsel aangedaan is, zoals bijvoorbeeld na een beroerte of na het zetten van een kunstknie. Bij veel patiënten met een |
|---|---|

contractuur wordt therapie gegeven in de vorm van rekbehandelingen. Het doel hiervan is de verkorte spieren en pezen weer langer te maken.

Er zijn verschillende vormen van rekken. Er kan bijvoorbeeld gerekt worden door met veel kracht het gewricht naar de eindstand te brengen en vervolgens het gewricht vast te zetten met bijvoorbeeld gips. Er kan ook gerekt worden door een constante lichte kracht uit te oefenen op het gewricht door middel van een spalk met een veer. Beide manieren worden regelmatig toegepast, maar het is niet bekend welke van deze twee manieren het beste resultaat geeft. Ook is niet bekend met hoeveel kracht, hoe lang en hoe vaak er het beste gerekt kan worden, en wat het effect is van deze verschillende rekmethoden op spierfunctie. In dit project bestuderen we hoe spier- en peesweefsel zich aanpast bij verschillende rekbehandelingen na het opleggen van een contractuur.

We zullen dit onderzoeken door eerst een contractuur te veroorzaken in het enkelgewricht van een rat. Daarna krijgen de ratten dagelijks voor 4 weken 2 uur per dag verschillende rekbehandelingen of een placebo behandeling. Hierna wordt bij de ratten onder algehele narcose de eindstand van het gewricht, de spier(vezel)- en peeslengte, de spierkracht en zintuiglijke functie gemeten. Nadat de spieren uit het dier zijn gehaald wordt het dier gedood met een overdosis van het narcosemiddel.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Met deze studie wordt er meer kennis vergaard over de manier waarop pezen en skeletspieren en de signalen die ze versturen zich aanpassen wanneer ze worden blootgesteld aan rek als er sprake is van een contractuur. Het voorgestelde diermodel geeft de mogelijkheid tot een gedetailleerde studie waarin niet alleen de gevolgen voor de eigenschappen van het gewricht bepaald kunnen worden, maar ook die van de spieren en pezen. De uitkomsten van dit onderzoek zullen een beter beeld geven van het type behandeling waarmee de beste resultaten worden behaald.

Contracturen komen voor bij veel verschillende aandoeningen van neurologische aard en van het spierskeletstelsel. Zo komen contracturen in 80% van in het ziekenhuis opgenomen patiënten met hersenletsel voor. Op dit moment is niet duidelijk welke methode van rekken het beste resultaat geeft en waarom. Zo wordt nu de opgelegde kracht en de methode van de rek behandeling gebaseerd op de voorkeur van de behandelaar en de verdraagzaamheid jegens rek van de patiënt in plaats van wat het beste resultaat biedt voor de gewrichten en spieren. Een beter begrip van de aanpassingen van de gewrichten, spieren en pezen helpt de behandelaar bij het kiezen van de beste behandelingsmethode voor de patiënt. De uitkomsten uit deze studie zullen gebruikt worden om de variabelen te optimaliseren in een humane studie.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Maximaal 195 ratten zullen worden gebruikt.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De meerderheid van de dieren (66%) zal matig ongerief ervaren veroorzaakt door de contractuuroperatie en de rekbehandeling. De ingrepen zijn klein en van korte duur, en naderhand kan de rat met rust gelaten worden. Licht ongerief wordt veroorzaakt door de verdoving die wordt gegeven voor de terminale meting waarna het dier wordt dood gemaakt. Een deel van de dieren (34%) ondergaat alleen terminaal ongerief als gevolg van het doden onder anesthesie.

- |   |  |
|---|--|
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Het ongerief is matig bij <b>66%</b> procent van de dieren en het ongerief is terminaal bij de overige <b>34%</b> . Alle dieren worden na de handeling onder volledige narcose gedood. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?                               | De dieren worden na afloop van de experimenten gedood, waarna weefsel wordt gebruikt voor onderzoek.   |

## 4 Drie V's

- |  |  |
|--|--|
| <p>4.1 <b>Vervanging</b><br/>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdierlijke alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>     | <p>Dit onderzoek moet bij dieren worden uitgevoerd om het proces van weefsel aanpassing bij rekken te kunnen nabootsen en de eigenschappen van de betrokken weefsels gedetailleerd te kunnen onderzoeken. Dit kan niet met celkweek, omdat het niet mogelijk is om hele spieren te kweken en langdurig in leven te houden. Ook de spierweefselmonsters (biopten) die bij mensen kunnen worden afgenomen zijn te klein. Er zijn wiskundige modellen ontworpen die spier en pees gedrag kunnen nabootsen, maar er zijn geen modellen waarmee veranderingen in dat weefsel gesimuleerd kunnen worden.</p>   |
| <p>4.2 <b>Vermindering</b><br/>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>   | <p>Het onderzoek wordt uitgevoerd met behulp van 'standard operating procedures' om variatie tussen individuele experimenten te voorkomen. Doormiddel van een statistische analyse en gefaseerde opzet wordt gewaarborgd dat het optimale aantal dieren wordt gebruikt. Het aantal dieren wordt verder beperkt door alle procedures eerst uitvoerig te oefenen op dode dieren uit andere studies. Ook worden de kracht en duur van de rekbehandeling geoptimaliseerd om het aantal behandelgroepen laag te houden. Er worden meerdere metingen uitgevoerd op één dier.</p>   |
| <p>4.3 <b>Verfijning</b><br/>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p> | <p>Er is veel ervaring met de voorgestelde procedures en het proefdiermodel in ons laboratorium. Muizen zijn te klein zijn voor het goed uitvoeren van de experimentele procedures. Het spierweefsel en de bouw van de skeletspieren van de rat zijn voor het grootste deel vergelijkbaar met die van de mens. Ook zijn de fysiologische mechanismen die betrokken zijn bij de aanpassingen van spieren en pezen door rek hetzelfde.</p>   |
| <p>Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.</p>                       | <p>Alle handelingen zullen worden uitgevoerd door gekwalificeerd personeel met veel ervaring in de specifieke handelingen. Bij de operaties wordt algehele anesthesie en effectieve pijnbestrijding toegepast. Alle dieren worden continu gemonitord op een aantal belangrijke kenmerken, waaronder welzijn, om het ongerief bij de dieren zoveel mogelijk te kunnen beperken. Bij hoger ongerief dan verwacht worden de humane eindpunten toegepast. De rek behandeling wordt toegepast terwijl de ratten licht verdoofd zijn zodat ze niet merken dat ze vast zitten en zo min mogelijk ongerief ervaren (matig ongerief). Vooraf worden de verschillende rek protocollen verfijnd in optimalisatie protocollen. Hierdoor zullen minder verschillende rek-behandelingen getest hoeven te worden.</p> |

---

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

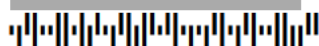


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD 5.1 lid2h 202114471

**Bijlagen**

3

Datum 31 mei 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 2 februari 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114471. 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 juni 2021 tot en met 31 maart 2025.

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

**Procedure**

*Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 7 mei 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

**Overwegingen**

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

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

**Datum:**

31 mei 2021

**Aanvraagnummer:**AVD **5.1 lid2h** 202114471

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**5.1 lid2h**

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

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:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2021 tot en met 31 maart 2025, voor het project "Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures" met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup>202114471, na advies van <sup>5.1 lid2h</sup>. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is <sup>5.1 lid2e</sup>. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Analist (onderzoeksmedewerker) verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 2 februari 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 mei 2021;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model, zoals ontvangen op 7 mei 2021;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 7 mei 2021;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 7 mei 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.4.1 Muscle-tendon unit stretching in a contracture rat model</b>			
	Ratten (Rattus norvegicus) / Wistar	195	34,0% Terminaal 66,0% Matig

### Geldende voorschriften

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

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



**Aanvraagnummer:**

AVD<sup>5.1 lid2n</sup> 202114471

## 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:**AVD 5.1 lid 2f 202114471

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.

**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114471  
**Datum:** woensdag 9 juni 2021 11:58:32

---

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 02-02-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Effects of stretch on musculoskeletal mechanical, sensory and morphological properties in contractures' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114471.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 1-6-2021.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt wel/niet op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

U geeft in uw advies aan dat dit advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. De CCD waardeert het dat de discussie waarom de beslissing niet unaniem is gemaakt, helder in uw advies verwoord is. Het is goed navolgbaar voor de CCD hoe de discussie binnen de DEC verlopen is.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)