



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ, ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΕΣ ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ

ΟΙ ΠΕΡΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΥΗΜΕΡΙΑΣ ΤΩΝ ΖΩΩΝ (ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ) ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ 2013 ΚΑΙ 2017

ΑΙΤΗΣΗ ΓΙΑ ΕΚΔΟΣΗ/ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΑΔΕΙΑΣ ΕΡΓΟΥ

ΤΙΤΛΟΣ ΤΟΥ ΕΡΓΟΥ

MRI-guided robotic system for non-invasive focused ultrasound surgery.

1.ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΙΤΗΤΗ

Ο κάτοχος της άδειας είναι υπεύθυνος για τη συνολική υλοποίηση του έργου και τη συμμόρφωσή προς τους όρους αδειοδότησης του

Όνομα και Επώνυμο	Χριστάκης Δαμιανού
Αριθμός Δελτίου Ταυτότητας	624033
Προσόντα	Διδακτορικό Ηλεκτρολογία
Ιδιότητα	Επιστημονικός υπεύθυνος του έργου
Ταχυδρομική Διεύθυνση (εργασίας)	ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ Αρχ. Κυπριανού 30, 3036 Λεμεσός
Τηλέφωνο επικοινωνίας	25-002039
Ηλεκτρονική Διεύθυνση	christakis.damianou@cut.ac.cy
Αριθμός προσωπικής άδειας (όπου ισχύει)	CY/EXP/P.L1/2009/R1/2015
Προηγούμενη άδεια έργου και ημερομηνία λήξης (όπου ισχύει)	CY/EXP/PR.L4/2009, CY/EXP/PR.L5/2015, CY/EXP/PR.L4/2015,

2.ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΡΓΟΥ

Χρηματοδότηση του έργου	CYPRUS SEEDS
Προτεινόμενη διάρκεια του έργου	13 μήνες
Επάρκεια των ατόμων που συμμετέχουν στο έργο	Άδεια για Χριστάκη Δαμιανού CY/EXP/P.L1/2009/R1/2015 Κτηνίατρος Κυριάκος Σπανούδης CY/EXP/P.L01/2020

2.1 Σκοπός του έργου

Έκδοση: 1/2018

(Επιλέξτε τουλάχιστον μία κεντρική κατηγορία και υποκατηγορία όπου απαιτείται. Τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για την υποβολή στατιστικών πληροφοριών στην ΕΕ. Για διευκρινίσεις σχετικά με την επιλογή κατηγορίας, παρακαλώ αναφερθείτε στην Εκτελεστική απόφαση 2012/707/ΕΕ σχετικά με τον καθορισμό κοινής μορφής για την υποβολή πληροφοριών.)

☐ **Βασική έρευνα, η οποία αφορά:**

- ☒ Ογκολογία (PB1)
- ☐ Καρδιαγγειακό, Αίμα, Λεμφικό Σύστημα (PB2)
- ☐ Νευρικό Σύστημα (PB3)
- ☐ Αναπνευστικό Σύστημα (PB4)
- ☐ Γαστρεντερικό Σύστημα, συμπεριλαμβανομένου του Ήπατος (PB5)
- ☐ Μυοσκελετικό Σύστημα (PB6)
- ☐ Ανοσοποιητικό Σύστημα (PB7)
- ☐ Ουρογεννητικό / Αναπαραγωγικό Σύστημα (PB8)
- ☐ Αισθητήρια Όργανα (δέρμα, οφθαλμούς, ώτα) (PB9)
- ☐ Ενδοκρινικό Σύστημα / Μεταβολισμός (PB10)
- ☐ Πολυσυστημικές έρευνες (PB11)
- ☐ Ηθολογία, συμπεριφορά και βιολογία των ζώων (PB12)
- ☐ Άλλες μελέτες (PB13)

Προσδιορίστε:

☐ **Μεταγραφική ή εφαρμοσμένη έρευνα, η οποία αφορά:**

- ☐ Ανθρώπινες ασθένειες:
 - ☒ Ογκολογία (PT21)
 - ☐ Λοιμώδη Νοσήματα (PT22)
 - ☐ Καρδιαγγειακό Σύστημα (PT23)
 - ☐ Νευρικό Σύστημα (PT24)
 - ☐ Αναπνευστικό Σύστημα (PT25)
 - ☐ Γαστρεντερικό Σύστημα, συμπεριλαμβανομένου του Ήπατος (PT26)
 - ☐ Μυοσκελετικό Σύστημα (PT27)
 - ☐ Ανοσοποιητικό Σύστημα (PT28)
 - ☐ Ουρογεννητικό / Αναπαραγωγικό Σύστημα (PT29)
 - ☐ Αισθητήρια Όργανα (δέρμα, οφθαλμούς, ώτα) (PT30)
 - ☐ Ενδοκρινικό Σύστημα / Μεταβολισμός (PT31)
 - ☐ Άλλες ανθρώπινες ασθένειες (PT32)

Προσδιορίστε:

- ☐ Ασθένειες και διαταραχές των ζώων (PT33)
- ☐ Καλή διαβίωση (Ευζωία) των ζώων (PT34)
- ☐ Διάγνωση ασθενειών (PT35)

☐ Ασθένειες των φυτών (PT36)

☐ Τοξικολογικές / οικοτοξικολογικές μελέτες (εκτός κανονιστικών ρυθμίσεων) (PT37)

☐ Προστασία του φυσικού περιβάλλοντος με γνώμονα την υγεία ή την καλή διαβίωση ανθρώπων και ζώων (PE40)

☐ Έρευνα με σκοπό την προστασία / διατήρηση ζωικών ειδών (PS41)

☐ Ανώτερη εκπαίδευση ή κατάρτιση για την απόκτηση, διατήρηση ή βελτίωση επαγγελματικών δεξιοτήτων (PE42)

☐ Ιατροδικαστικές έρευνες (PF43)

☐ Διατήρηση αποικιών εδραιωμένων γενετικά τροποποιημένων ζώων που δεν χρησιμοποιούνται σε άλλες διαδικασίες (PG43)

☐ Κανονιστική χρήση (χρήση στο πλαίσιο νομοθετικών ρυθμίσεων), που αφορά:

☐ Συνήθη παραγωγή – Προϊόντα με βάση το αίμα (PR51)

☐ Συνήθη παραγωγή – Μονοκλωνικά αντισώματα (PR52)

☐ Συνήθη παραγωγή - Άλλα (PR53)

Προσδιορίστε:

☐ Ποιοτικό έλεγχο – Δοκιμές ασφαλείας παρτίδων (PR61)

☐ Ποιοτικό έλεγχο – Δοκιμές πυρετογένεσης (PR62)

☐ Ποιοτικό έλεγχο – Δοκιμές ασφαλείας παρτίδων (PR63)

☐ Ποιοτικό έλεγχο – Άλλα (PR64)

Προσδιορίστε:

☐ Άλλες δοκιμές

αποτελεσματικότητας και ανοχής (PR71)

☐ Δοκιμές οξείας και υποξείας τοξικότητας – Άλλες θανατηφόρες μέθοδοι (PR82)

☐ Δοκιμές οξείας και υποξείας τοξικότητας – Μη θανατηφόρες μέθοδοι (PR83)

☐ Δοκιμές τοξικότητας και άλλες δοκιμές ασφαλείας:

☐ Ερεθισμός / διάβρωση του δέρματος (PR84)

☐ Δερματική ευαισθητοποίηση (PR85)

☐ Ερεθισμός / διάβρωση των οφθαλμών (PR86)

☐ Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης – μέχρι και 28 ημέρες (PR87)

☐ Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης – 29-90 ημέρες (PR87)

☐ Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης – > 90 ημέρες (PR87)

☐ Καρκινογένεση (PR90)

☐ Γονιδιοτοξικότητα (PR91)

☐ Τοξικότητα για την αναπαραγωγή (PR92)

☐ Τοξικότητα για την ανάπτυξη του εμβρύου (PR93)

☐ Νευροτοξικότητα (PR94)

☐ Κινητική (φαρμακοκινητική, τοξικοκινητική, απομάκρυνση καταλοίπων) (PR95)

☐ Φαρμακοδυναμική (συμπεριλαμβανομένης της φαρμακολογίας ασφαλείας) (PR96)

- ☐ Φωτοτοξικότητα (PR97)
- ☐ Οικοτοξικότητα – Οξεία τοξικότητα (PR98)
- ☐ Οικοτοξικότητα – Χρόνια τοξικότητα (PR99)
- ☐ Οικοτοξικότητα – Τοξικότητα για την αναπαραγωγή (PR100)
- ☐ Οικοτοξικότητα – Ενδοκρινική δραστηριότητα (PR101)
- ☐ Οικοτοξικότητα – Βιοσυσσωρευση (PR102)
- ☐ Οικοτοξικότητα – Άλλα (PR103)

Προσδιορίστε:

- ☐ Δοκιμές ασφαλείας τροφίμων και ζωοτροφών (PR104)
- ☐ Ασφάλεια στοχευόμενων ζώων (PR105)
- ☐ Άλλα (PR106)

Προσδιορίστε:

Σε περίπτωση που το έργο αφορά δοκιμές βάσει νομοθεσίας, αυτές αφορούν:

- ☐ Νομοθεσία για τα φαρμακευτικά προϊόντα ιατρικής χρήσης (LT1)
- ☐ Νομοθεσία για τα φαρμακευτικά προϊόντα κτηνιατρικής χρήσης και τα κατάλοιπά τους (LT2)
- ☒ Νομοθεσία για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα (LT3)
- ☐ Νομοθεσία για τα βιομηχανικά χημικά προϊόντα (LT4)
- ☐ Νομοθεσία για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (LT5)
- ☐ Νομοθεσία για τα βιοκτόνα (LT6)
- ☐ Νομοθεσία για τα τρόφιμα και τα υλικά που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (LT7)
- ☐ Νομοθεσία για τις ζωοτροφές, για την ασφάλεια των στοχευόμενων ζώων, των εργαζομένων και του περιβάλλοντος (LT8)
- ☐ Νομοθεσία για τα καλλυντικά (LT9)
- ☐ Άλλη νομοθεσία (LT10):

Προσδιορίστε:

Το έργο σχετίζεται με νομοθετικές απαιτήσεις:

- ☒ Νομοθεσία ανταποκρινόμενη στις απαιτήσεις της ΕΕ (LO1)
- ☒ Νομοθεσία ανταποκρινόμενη μόνο σε εθνικές απαιτήσεις (LO2)
- ☐ Νομοθεσία ανταποκρινόμενη μόνο σε απαιτήσεις που δεν είναι της ΕΕ (LO3)
- ☐ Δεν υπάρχει νομοθετική απαίτηση

2.2 Υπάρχον επίπεδο γνώσης/Διαθεσιμότητα του υπό εξέταση προϊόντος

Για να αξιολογηθεί η συνάφεια και η αξία των στόχων του έργου πρέπει να γίνει κατανοητό το υπάρχον επίπεδο γνώσης ή διαθεσιμότητα του υπό εξέταση προϊόντος πάνω στο οποίο το προτεινόμενο έργο θα βασιστεί.

Για έργα δοκιμών ή διαλογής: να αναφερθούν οι σχετικές κανονιστικές απαιτήσεις ή κατευθυντήριες γραμμές. Για έργα παροχής υπηρεσιών ή παραγωγής (όπως η παραγωγή προϊόντων αίματος/αντισωμάτων· νέων σειρών γενετικά τροποποιημένων ζώων): να αναφερθούν οι πιθανές απαιτήσεις όσον αφορά την υπηρεσία ή το προϊόν κατά τη διάρκεια ισχύος της άδειας.

Για έργα βασικής έρευνας: να αναφερθεί το τρέχον επίπεδο γνώσεων στις οποίες θα βασιστεί το έργο και ο τρόπος με τον οποίο θα βοηθήσει το έργο στην προαγωγή της γνώσης

Όπου εφαρμόζεται θα πρέπει επίσης να συμπεριληφθούν οι στόχοι που έχουν ήδη επιτευχθεί στο πλαίσιο προηγούμενου(-ων) έργου(-ων) (κατά περίπτωση): συνοψίζεται η πρόοδος που έχει επιτευχθεί και αναφέρονται οι ειδικοί στόχοι που θα πρέπει να επιτευχθούν στο πλαίσιο του παρόντος έργου.

Το πρώτο σύστημα εστιασμένων υπερήχων (FUS) κατασκευάστηκε το 1940 [1] και η εν λόγω τεχνολογία βρισκόταν σε πειραματικό στάδιο για πάνω από 70 χρόνια. Με την τεχνολογία FUS υπάρχει η δυνατότητα συγκέντρωσης της υπερηχητικής δέσμης σε ένα στοχευμένο σημείο για να προκαλέσει αύξηση της θερμοκρασίας μεταξύ 60-80 °C. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε θερμική νέκρωση λόγω πήξης του ιστού. Κάθε ριπή υπερήχου θερμαίνει μόνο ένα μικρό εστιακό στόχο, επομένως, πρέπει να πραγματοποιηθούν πολλαπλές ριπές υπερήχων για να επιτευχθεί θερμική νέκρωση σε ολόκληρο το στόχο [1]. Λόγω του μηχανισμού διάδοσης των υπερήχων, αυτή η τεχνική πρέπει να εκτελείται με προσοχή κοντά σε νεύρα, οστά και το ορθό.

Μόλις πρόσφατα η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε σε εγκεκριμένες κλινικές εφαρμογές. Δύο συσκευές FUS διατίθενται σήμερα για θεραπεία καρκίνου του προστάτη: Ablatherm (EDAP TMS SA, Vaulx-en-Velin, Γαλλία) [3] και Sonablate (Focus Surgery Inc., Indianapolis, IN, ΗΠΑ).

Πρόσφατα, έχει προταθεί η τεχνολογία εστιασμένων υπερήχων με καθοδήγηση μαγνητικού τομογράφου (MRgFUS) λόγω της δυνατότητας για σχεδιασμό και παρακολούθηση της θεραπείας σε σχεδόν πραγματικό χρόνο [6]. Αυτή η τεχνική έχει εγκριθεί από το FDA για την αντιμετώπιση των ινομυωμάτων. Τα συστήματα που παράγονται από την InSightec επεκτάθηκαν πολύ γρήγορα την τελευταία δεκαετία και σε άλλες εφαρμογές όπως η θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, του καρκίνου του μαστού [8], του ήπατος [9] και για την ανακούφιση του πόνου από μεταστατικό καρκίνο των οστών [10]. Πρόσφατα, η InSightech ανέπτυξε ένα σύστημα MRgFUS το οποίο είναι ικανό για την θεραπεία του Essential Tremor (ET) με μη επεμβατική μέθοδο [11]. Αυτή η εφαρμογή θεωρείται το πρότυπο και καθιερώνει την τεχνολογία FUS ως ασφαλή, αποτελεσματική και μη επεμβατική επέμβαση.

Η τεχνολογία εστιασμένων υπερήχων προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους θεραπείας όπως η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοβολία. Η θεραπεία με εστιασμένους υπερήχους είναι μη επεμβατική, επομένως μειώνονται σημαντικά οι κίνδυνοι. Οι εστιασμένοι υπερήχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόκληση θερμικής νέκρωσης σε ιστούς ή για τοπική ενίσχυση θεραπευτικής αγωγής. Επειδή δεν υπάρχει ιονίζουσα ακτινοβολία, η θεραπεία μπορεί να επαναληφθεί αν χρειαστεί.

REFERENCES

- [1]. Lynn JG, Zwemer RL, Chick AJ, Miller AE. A new method for the generation and use of focused ultrasound in experimental biology. J Gen Physiology 1942; 26: 179-93.
- [2]. Jolesz FA. MRI-guided focused ultrasound surgery. AnnuRev Med 2009; 60: 417-430.

- [3]. Blana A, et. al. Eight years' experience with highintensity focused ultrasonography for treatment of localized prostate cancer. *Urology* 2008; 72: 1329-1333; Discussion 1333-1334
- [4]. Murat FJ, et. al. Prognostic factors for salvage HIFU success after external beam radiation failure (EBRT) failure. *Eur Urol Suppl* 2008; 7: 119
- [5]. Warmuth M, et. al. Systematic review of the efficacy and safety of high-intensity focussed ultrasound for the primary and salvage treatment of prostate cancer. *Eur Urol* 2010; 58: 803-815
- [6]. Yehezkeli O, Freundlich D, Magen N, Marantz C, Medan Y, Vitek S, Weinreb A (2002) INSIGHTEC-TXSONICSLTD, assignee. Mechanical positioner for MRI guided ultrasound therapy system WO0209812.
- [7]. Napoli A, Anzidei M, De Nunzio C, Cartocci G, Panebianco V, De Dominicis C, Catalano C, Petrucci F, Leonardo C (2013) Real-time Magnetic Resonance-guided High-intensity Focused Ultrasound Focal Therapy for Localised Prostate Cancer:Preliminary Experience. *European Urology*, 63 (2 0 1 3) 3 9 5 – 3 9 8.
- [8]. Khiat A, Gianfelice D, Amara M, Boulanger Y (2006) Influence of post-treatment delay on the evaluation of the response to focused ultrasound surgery of breast cancer by dynamic contrast enhanced MRI. *The British Journal of Radiology*, 79:308-314.
- [9]. Kopelman D, Inbar Y, Hanannel A, Dank G, Freundlic (2006) Magnetic Resonance-guided Focused Ultrasound Surgery (MRgFUS). Four Ablation Treatments of a Single Canine Hepatocellular Adenoma. *HPB*, 8:292-298.
- [10]. Catane R, Beck A, Inbar Y, Rabin T, Shabshin N, Hengst S, Pfeffer RM, Hanannel A, Dogadkin O, Liberman B, Kopelman D (2006) MR-guided Focused Ultrasound Surgery (MRgFUS) for the Palliation of Pain in Patients with Bone Metastases-Preliminary Clinical Experience, *Annals of Oncology*, 18(1):163-7.
- [11]. Lipsman N, Schwartz M, Huang Y, Lee L, Sanka T, Chapman M, Hynynen K, Lozano A (2013) MR-guided focused ultrasound thalamotomy for essential tremor: a proof-of-concept study. *Lancet Neurol* 12: 462–68

2.3 Αναμενόμενα Οφέλη

Για τη διενέργεια της ανάλυσης θλάθης-οφέλους του έργου, προκειμένου να εκτιμηθεί αν η θλάβη στα ζώα αιτιολογείται από το προσδοκώμενο αποτέλεσμα πρέπει να περιληφθούν επαρκείς πληροφορίες που αφορούν τα οφέλη που ενδέχεται να προκύψουν από το έργο καθώς και την πιθανότητα επίτευξης αυτών των οφελών.

Ποιά θα είναι τα οφέλη;

Ποιός θα επωφεληθεί,

Πώς θα μπορέσουν να υλοποιηθούν τα οφέλη;

Βραχυπρόθεσμα, μεσοπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα οφέλη.

Η προτεινόμενη τεχνολογία σκοπεύει να εξυπηρετήσει την κοινότητα της μη επεμβατικής χειρουργικής χρησιμοποιώντας θεραπευτικούς υπέρηχους και καθοδήγηση με μαγνητική τομογραφία για ογκολογικές εφαρμογές στην κοιλιακή χώρα. . Ο μακροπρόθεσμος στόχος είναι να εμπορευματοποιηθεί αυτή η τεχνολογία (μέχρι το τέλος του έργου θα είναι στην κατάσταση του προηγμένου προτοτυπου). Ελπίζουμε με θετικά αποτελέσματα από τα πειράματα αξιολόγησης, να προχωρήσουμε στην αδειοδότηση της προτεινόμενης συσκευής (π.χ. σήμανση CE).

2.4 Στόχοι του έργου

Περιγραφή του γενικού στόχου του έργου καθώς και τυχόν δευτερευόντων στόχων, ή/και της επιστημονικής υπόθεσης που θα διερευνηθεί.

Οι στόχοι πρέπει να είναι ειδικοί, μετρήσιμοι, επιτεύξιμοι, ρεαλιστικοί και χρονικά προσδιορισμένοι.

Ο κύριος στόχος προγράμματος ABLASONIC είναι η δημιουργία ενός ρομποτικού συστήματος με καθοδήγηση μαγνητικής τομογραφίας (MRgFUS) για ογκολογικές εφαρμογές στην κοιλιακή χώρα.. Ο στόχος είναι να παραχθεί ένα ρομποτικό σύστημα (προηγμένο προτοτυπο) με 3 βαθμούς ελευθερίας που

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για καθοδήγηση εστιασμένων υπερήχων σε ασθενείς. Η θέρμανση των ιστών μπορεί να παρακολουθείται με ακρίβεια μέσω της θερμομετρίας από τον μαγνητικό τομογράφο. Το σύστημα εστιασμένων υπερήχων θα περιλαμβάνει πηγή υπερήχων ενός στοιχείου (διαμέτρου 50 mm) και θα λειτουργεί σε συχνότητα 1.1 MHz. Θα αναπτυχθεί ένα λογισμικό που θα ελέγχει την ιατρική συσκευή. Το σύστημα θα αξιολογηθεί σε πλασματικά υλικά, νεκρούς ιστούς και σε ζώα (κουνέλια). Μέχρι το τέλος του προγράμματος όλα τα απαραίτητα έγγραφα θα είναι έτοιμα για αίτηση ευρεσιτεχνίας.

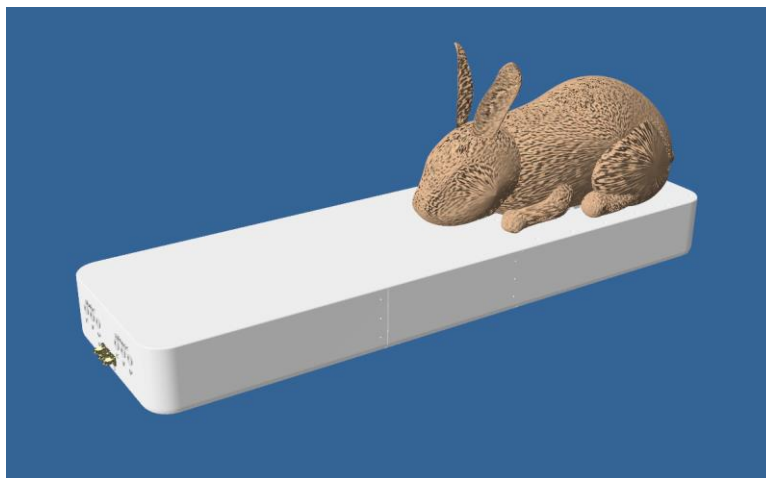
Η προτεινόμενη τεχνολογία στοχεύει να εξοπλίσει την κοινότητα που εμπλέκεται σε ογκολογικές δραστηριότητες μη επεμβατικής χειρουργικής επέμβασης με την χρήση θεραπευτικών υπερήχων και καθοδήγηση μαγνητικής τομογραφίας. Ο μακροπρόθεσμος στόχος είναι η εμπορευματοποίηση αυτής της τεχνολογίας (μέχρι το τέλος του έργου θα είναι στην κατάσταση του προηγμένου πρωτότυπου). Ευελπιστούμε ότι θα έχουμε θετικά αποτελέσματα από τα πειράματα αξιολόγησης.

2.5 Περιγραφή του έργου/Πρόγραμμα εργασίας

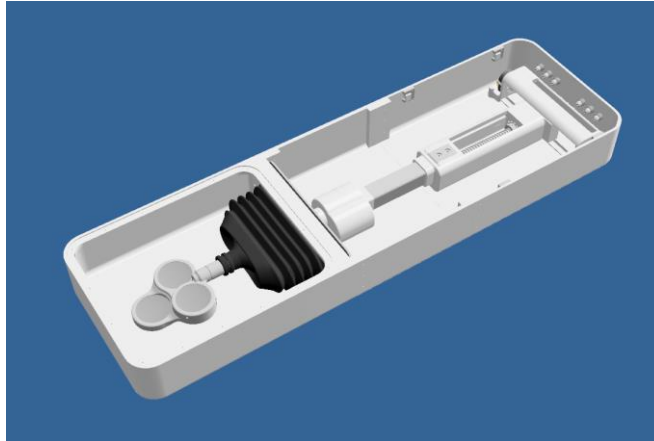
Εδώ συνδέονται οι στόχοι του έργου με τις διαδικασίες

Περιγράψτε τα στάδια του προγράμματος εργασίας και αναφέρετε με σαφήνεια χρησιμοποιώντας ένα διάγραμμα ροής ή χάρτη διαδικασιών με σχόλια με ποιόν τρόπο θα χρησιμοποιηθεί κάθε διαδικασία για την επίτευξη των στόχων σας. Όπου εφαρμόζεται θα πρέπει να περιλαμβάνει τη χρήση πιλοτικών μελετών και τα διάφορα σημεία λήψης αποφάσεων.

Ο στόχος του ABLASONIC είναι η δημιουργία ενός συστήματος θεραπευτικών υπερήχων με καθοδήγηση μαγνητικού τομογράφου για θεραπεία όγκων στην κοιλιακή χώρα (συνώτι, νεφρό και πάγκρεας). Το σύστημα θα περιλαμβάνει πηγή υπερήχων η οποία θα τοποθετηθεί σε ένα ρομποτικό σύστημα 3 βαθμών ελευθερίας (X, Y και Θ). Η εικόνα 2 παρουσιάζει την ιδέα του συστήματος όπως θα τοποθετείται στον τραπέζι του μαγνητικού τομογράφου, με το ζώο να τοποθετείται στην πλάγια θέση. Το σύστημα θα αξιολογηθεί εκτεταμένα με τη χρήση κατάλληλων μοντέλων από πλασματικά υλικά, σε νεκρό ιστό και σε ζώα. Η εικόνα 3 δείχνει το προκαταρκτικό σχέδιο AUTOCAD του ρομποτικού συστήματος 3 βαθμών ελευθερίας.



Εικόνα 2: Τοποθέτηση του κουνελιού πάνω στο ρομποτικό σύστημα 3^{ων} βαθμών ελευθερίας μέσα στον μαγνητικό τομογράφο.



Εικόνα 3: Μηχανικά μέρη του ρομποτικού συστήματος 3^{ov} άξόνων.

Σχεδιασμός και δημιουργία συσκευής και λογισμικού

Θα σχεδιαστεί μία πηγή υπερήχων ενός στοιχείου που θα είναι συμπαγής (διάμετρου 50 mm), που θα έχει την κατάλληλη ακτίνα καμπυλότητας ούτως ώστε να εστιάζει την δέσμη υπερήχων. Επίσης θα σχεδιαστεί ένα ρομποτικό σύστημα 3 βαθμών ελευθερίας το οποίο θα φέρει την πηγή υπερήχων. Θα σχεδιαστεί επίσης ένα ηλεκτρονικό σύστημα για τον έλεγχο λειτουργίας του συστήματος υπερήχων και του ρομποτικού συστήματος. Όλα τα εξαρτήματα αυτής της συσκευής θα τοποθετηθούν σε ένα ειδικά διαμορφωμένο καρότσι.

Δοκιμή συστήματος

Αρχικά θα δημιουργήσουμε διακριτά καψίματα σε νεκρό ιστό και πλασματικά υλικά χωρίς κίνηση μεταβάλλοντας την ισχύ, και τον χρόνο ηχοβολήσης έχοντα συχνότητα (1.1 MHz. Με αυτό το τρόπο θα επιλέξουμε τα κατάλληλες παραμέτρους του ηχοβολέα θεραπευτικών υπερήχων.

Ακολούθως θα προκληθούν θερμικά καψίματα σε νεκρό ιστό και πλασματικό υλικό κινώντας τον ηχοβολέα στους 3 άξονες κίνησης (X, Y, Θ).

Κατόπιν τούτου, θα γίνει αξιολόγηση της μεθόδου (τόσο σε πλασματικά υλικά όσο και σε νεκρό ιστό) με καθοδήγηση σε μαγνητικό τομογράφο όπως επίσης και θερμομετρία με τη μέθοδο Proton Resonance Frequency Shift (PRFS). Η μέθοδος αυτή θα δοκιμαστεί σε πλασματικό υλικό (αγαρόζης / διοξειδίου του πυριτίου). Για τον εντοπισμό της εστίας των υπερήχων θα χρησιμοποιηθεί η γρήγορη ακολουθία fast spoiled gradient (FSPGR). Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας στην εστία, το σήμα ελαττώνεται και επομένως στην οθόνη ο χρήστης μπορεί να δει την εστία ως μαύρη κηλίδα. Με τη FSPGR ο χρόνος απεικόνισης είναι περίπου 5 δευτερόλεπτα. Με το πλασματικό υλικό θα δοκιμάσεται η συμβατότητα της πηγής υπερήχων με τον μαγνητικό τομογράφο και η δυνατότητα της πηγής για δυνατότητα δημιουργίας θερμικής νέκρωσης του ιστού χρησιμοποιώντας ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο

Τα πειράματα σε πλασματικά υλικά και σε νεκρούς ιστούς θα γίνουν ούτως ώστε να υπολογιστούν οι κατάλληλοι παράμετροι για τους υπερήχους και ως αποτέλεσμα τα πειράματα σε ζώα θα περιοριστούν. Η πρόκληση διεξαγωγής πειραμάτων σε ζώα σε σχέση με τα πλασματικά υλικά και τους νεκρούς ιστούς είναι η ύπαρξη ροής αίματος που θα μειώνει την θερμοκρασία και επιπλέον η κίνηση του ζώου λόγω της αναπνοής

Δοκιμή συστήματος in vivo.

Το σύστημα τελικά θα αξιολογηθεί σε ζώα (κουνέλια) σε στόχους στην κοιλιακή χώρα υπο καθοδήγηση υπερήχου (στο εργαστήριο μας ή μαγνητικού τομογράφου (Υγεία Πολυκλινική).

2.6 Βιβλιογραφία

Επισυνάψετε κατάλογο με έως 10 βασικές βιβλιογραφικές αναφορές και/ή κανονιστικές κατευθυντήριες γραμμές οι οποίες να στηρίζουν την ανάγκη ανάληψης του έργου και/ή τα αναμενόμενα οφέλη καθώς και σχετικές αναφορές για τα ζωικά πρότυπα και τις μεθόδους που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.

Η χρήση των κουνελιών στον τομέα των θεραπευτικών υπερήχων αναφέρεται σε πάρα πολλές δημοσιεύσεις κοντά στις 800 σύμφωνα με το Pubmed, Δεκ 2018). Ενδεικτικά αναφέρουμε ορισμένες που δείχνουν το εύρος εφαρμογών που καλύπτονται με την χρήση κουνελιών. Τα κουνέλια χρησιμοποιούνται με εμφυτευμένους όγκους στο μυ [1], για έρευνα στο τομέα της αιμόστασης [2], για όγκους στο σπυκώτι [3,7, 16], για πνεύμονες [4], για οστεοαρθρίτιδα [5], για ανευρύσματα [6], για θρομβόλυση [8,12], για εγκέφαλο [9-10, 14, 15, 17, 18, 20], για στήθος [11], για οστά [13], και για νεφρό [19]. Συνεπώς το μοντέλο του κουνελιού είναι ευρέως δοκιμασμένο και αποτελεσματικό. Ανάλογα με την εφαρμογή αυτό είναι πολύ αποτελεσματικό με χαμηλό κόστος. Η ομάδα μας έχει ήδη αρκετή πείρα με κουνέλια [8, 10, 15].

- [1] Y. Sun *et al.*, “Enhancing tissue permeability with MRI guided preclinical focused ultrasound system in rabbit muscle: From normal tissue to VX2 tumor,” *J. Control. Release*, vol. 256, pp. 1–8, Jun. 2017.
- [2] D.-W. Zhao, M. Tian, J.-Z. Zou, Y.-Y. Zheng, and T. Li, “Effects of Non-Focused Microbubble-Enhanced and High-Intensity Focused Ultrasound on Hemostasis in a Rabbit Model of Liver Trauma,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 43, no. 3, pp. 629–639, Mar. 2017.
- [3] Y. Gong *et al.*, “Low-intensity focused ultrasound mediated localized drug delivery for liver tumors in rabbits,” *Drug Deliv.*, pp. 1–10, Nov. 2014.
- [4] N. Takayama *et al.*, “The effect of ultrasound with acoustic radiation force on rabbit lung tissue: a preliminary study,” *J. Med. Ultrason.*, vol. 43, no. 4, pp. 481–485, Oct. 2016.
- [5] L. Jia, J. Chen, Y. Wang, Y. Zhang, and W. Chen, “Focused Low-intensity Pulsed Ultrasound Affects Extracellular Matrix Degradation via Decreasing Chondrocyte Apoptosis and Inflammatory Mediators in a Surgically Induced Osteoarthritic Rabbit Model,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, no. 1, pp. 208–219, Jan. 2016.
- [6] D. Coluccia *et al.*, “A microsurgical bifurcation rabbit model to investigate the effect of high-intensity focused ultrasound on aneurysms: a technical note,” *J. Ther. Ultrasound*, vol. 2, no. 1, p. 21, 2014.
- [7] L. LIU *et al.*, “Potential enhancement of intravenous nano-hydroxyapatite in high-intensity focused ultrasound ablation for treating hepatocellular carcinoma in a rabbit model,” *Oncol. Lett.*, vol. 7, no. 5, pp. 1485–1492, May 2014.
- [8] C. Damianou, V. Hadjisavvas, N. Mylonas, A. Couppis, and K. Ioannides, “MRI-guided Sonothrombolysis of Rabbit Carotid Artery,” *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, vol. 23, no. 2, pp. e113–e121, Feb. 2014.
- [9] K. Beccaria *et al.*, “Opening of the blood-brain barrier with an unfocused ultrasound device in rabbits,” *J. Neurosurg.*, pp. 887–898, Oct. 2013.
- [10] N. Mylonas and C. Damianou, “MR compatible positioning device for guiding a focused ultrasound system for the treatment of brain diseases,” *Int. J. Med. Robot. Comput. Assist. Surg.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2014.
- [11] D. Wang *et al.*, “Combination of high-intensity focused ultrasound with nanoscale ultrasound contrast agent in treatment of rabbit breast VX2 tumors: a pilot study,” *Clin. Imaging*, vol. 36, no. 6, pp. 717–723, Nov. 2012.
- [12] A. Burgess, Y. Huang, A. C. Waspe, M. Ganguly, D. E. Goertz, and K. Hynynen, “High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for Dissolution of Clots in a Rabbit Model of Embolic Stroke,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42311, Aug. 2012.
- [13] R. Wu *et al.*, “A rabbit bone tumor model for high-intensity focused ultrasound therapy,” *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.*, vol. 20, no. 4, pp. 206–211, Jul. 2011.
- [14] F. Wang *et al.*, “Focused Ultrasound Microbubble Destruction-Mediated Changes in Blood-Brain Barrier Permeability Assessed by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging,” *J. Ultrasound Med.*, vol. 28, no. 11, pp. 1501–1509, Nov. 2009.

- [15] C. Damianou, K. Ioannides, V. Hadjisavvas, N. Mylonas, A. Couppis, and D. Iosif, "In vitro and in vivo brain ablation created by high-intensity focused ultrasound and monitored by MRI," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 56, no. 6, pp. 1189–1198, Jun. 2009.
- [16] W. Luo, X. Zhou, X. Gong, M. Zheng, J. Zhang, and X. Guo, "Study of Sequential Histopathologic Changes, Apoptosis, and Cell Proliferation in Rabbit Livers After High-Intensity Focused Ultrasound Ablation," *J. Ultrasound Med.*, vol. 26, no. 4, pp. 477–485, Apr. 2007.
- [17] N. Vykhodtseva, N. McDannold, and K. Hynynen, "Induction of apoptosis in vivo in the rabbit brain with focused ultrasound and Optison®," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 32, no. 12, pp. 1923–1929, Dec. 2006.
- [18] N. J. McDannold, N. I. Vykhodtseva, and K. Hynynen, "Microbubble Contrast Agent with Focused Ultrasound to Create Brain Lesions at Low Power Levels: MR Imaging and Histologic Study in Rabbits," *Radiology*, vol. 241, no. 1, pp. 95–106, Oct. 2006.
- [19] W. W. Roberts, T. L. Hall, K. Ives, J. S. Wolf, J. B. Fowlkes, and C. A. Cain, "Pulsed Cavitation Ultrasound: A Noninvasive Technology for Controlled Tissue Ablation (Histotripsy) in the Rabbit Kidney," *J. Urol.*, vol. 175, no. 2, pp. 734–738, Feb. 2006.
- [20] N. McDannold, N. Vykhodtseva, S. Raymond, F. A. Jolesz, and K. Hynynen, "MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: Histological findings in rabbits," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 31, no. 11, pp. 1527–1537, Nov. 2005.

3.ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΖΩΩΝ

Αντικατάσταση

- Εξηγήστε γιατί απαιτείται η χρήση ζώων για την επίτευξη των στόχων του έργου και γιατί δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλη εναλλακτική μέθοδος χωρίς να περιλαμβάνει τη χρήση ζώων.
- Ποιές in vitro, in silico ή ex vivo τεχνικές θα χρησιμοποιηθούν και πως αυτές θα ενσωματωθούν στο έργο (όπου εφαρμόζεται)

(Η αιτιολόγηση να γίνει βάσει επιστημονικών δεδομένων και σχετικών βιβλιογραφικών αναφορών).

Για να γίνει θεραπεία με υπέρηχους χρειάζεται ζωντανός ιστός ώστε δοκιμαστεί η θεραπεία σε ζωντανό οργανισμό, όπου υπάρχει ροή αίματος. Επίσης σε ζωντανό ιστό από ζώο ή ακουστική εξασθένηση και η απορρόφηση των υπερήχων είναι παρόμοια με τους ανθρώπινους ιστούς.

Η μείωση των ζώων επιτυγχάνεται με την πραγματοποίηση πειραμάτων σε πλασματικά υλικά (phantoms). Τα πλασματικά υλικά θα αποτελούνται από αгарόζη όπου μπορεί να προσομοιωθούν οι ιδιότητες μαλακών ιστών που ρυθμίζονται με την κατάλληλη περιεκτικότητά των υλικών. Επιπλέον θα γίνουν πειράματα σε κομμάτια από φρέσκο κρέας για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή προσέγγιση συγκριτικά με ιστό ζώου.

Τα κουνέλια θεωρούνται καλό μοντέλο ζώου (οικονομικό) και εφαρμόζεται ευρέως από ερευνητές πριν προχωρήσουν σε μεγαλύτερα μοντέλα ζώων.

Οι διαδικασίες σε μεγαλύτερα ζώα, είναι δύσκολα προσβάσιμες και δαπανηρές.

Πηγές πληροφόρησης:

Έγγραφο εργασίας σχετικά με την αξιολόγηση έργων και αναδρομική αξιολόγηση

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/project_evaluation/el.pdf

(*) Έγγραφο εργασίας σχετικά με το πλαίσιο αξιολόγησης της δριμύτητας

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/severity/el.pdf

ARRIVE Guidelines

<https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/NC3Rs%20ARRIVE%20Guidelines%202013.pdf>

Ενδεικτική βιβλιογραφία για την αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων:

https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/now-available-ecvam-search-guide-on-alternatives-to-animal-testing_&http://altweb.jhsph.edu/resources/searchalt/

<https://www.mrc.ac.uk/research/research-involving-animals/guidance-resources-and-further-information/>

Diehl KH et al.(2001). A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21(1),15-23. doi.org/10.1002/jat.727

Μείωση

- Εξηγείστε πως θα διασφαλίσετε τη χρήση του μικρότερου αριθμού ζώων χωρίς να επηρεαστούν τα ερευνητικά αποτελέσματα. Τεκμηριώστε ότι δεν υπάρχει επανάληψη δοκιμών.
- Εξηγείστε τις αρχές του πειραματικού σχεδιασμού στις οποίες θα βασιστείτε και τυχόν πηγές που θα συμβουλευτείτε π.χ. όσον αφορά τα στατιστικά στοιχεία, τον πειραματικό σχεδιασμό.
- Αιτιολογήθηκε ο αριθμός των ζώων που θα χρησιμοποιηθούν βάσει κατάλληλης στατιστικής ανάλυσης; Εάν ναι παραπέμψτε στην εν λόγω ανάλυση. Εάν όχι, αιτιολογήστε για ποιον λόγο δεν πραγματοποιήθηκε η εν λόγω ανάλυση.

(Η αιτιολόγηση να γίνει βάσει επιστημονικών δεδομένων και σχετικών βιβλιογραφικών αναφορών).

Η μείωση των ζώων επιτυγχάνεται με την πραγματοποίηση πειραμάτων σε πλασματικά υλικά (phantoms). Τα πλασματικά υλικά θα αποτελούνται από αгарόζη όπου μπορεί να προσομοιωθούν οι ιδιότητες μαλακών ιστών που ρυθμίζονται με την κατάλληλη περιεκτικότητα των υλικών (agar, silica and evaporated milk). Επιπλέον θα γίνουν πειράματα σε φρέσκο κρέας για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή προσέγγιση συγκριτικά με ιστό ζώου.

Πλασματικό υλικό Αγαρόζης / διοξειδίου του πυριτίου / γάλακτος για απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η συμβατότητα της πηγής υπερήχων με το μαγνητικό τομογράφο θα δημιουργήσουμε κατάλληλο πλασματικό υλικό. Αυτό το πλασματικό υλικό θα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ικανότητας των υπερήχων για αύξηση της θερμοκρασίας χρησιμοποιώντας θερμομετρία μέσω του μαγνητικού τομογράφου. Για την παρασκευή του πλασματικού υλικού θα χρησιμοποιήσουμε αгарόζη, και διοξείδιο του πυριτίου το οποίο μπορεί να παραχθεί σε εργαστηριακό περιβάλλον με πολύ χαμηλό κόστος. Ακολούθως το μείγμα θα μπαίνει σε καλούπι και έτσι θα επιτυγχάνεται το απαιτούμενο μέγεθος και σχήμα του πλασματικού υλικού το οποίο θα είναι τέτοιο ώστε να μιμείται όσο το δυνατόν καλύτερα τις ακουστικές ιδιότητες των ιστών. Η σύζευξη των υπερήχων με το πλασματικό υλικό θα γίνεται με τη χρησιμοποίηση απαιερωμένου νερού το οποίο θα βρίσκεται στο δεξαμενή νερού στο μπροστινό τμήμα του ρομποτικού συστήματος.

Τα κουνέλια είναι λιγότερο επιθετικά στη φύση και έχουν λιγότερα προβλήματα υγείας σε σύγκριση με άλλα είδη ζώων.

Αιτιολόγηση αριθμού ζώων

Το σύστημα τελικά θα αξιολογηθεί σε ζώα (κουνέλια) στο με

α) Μονήρεις

β) πολλαπλές μή διακριτές αλλοιώσεις (πυκνό πλέγμα) και

γ) πολλαπλές διακριτές αλλοιώσεις (αραιό πλέγμα)

υπο καθοδήγηση α) υπερήχου ή β) μαγνητικού τομογράφου.

2 κουνέλια θα χρησιμοποιηθούν πιλοτικά για βελτιστοποίηση της τεχνικής υπο υπέρηχο και μαγνητικό τομογράφο.

#	Ήπαρ	Πάγκρεας	Νεφρός	Μονήρεις αλλοιώσεις	Πολλαπλές Μή διακριτές Αλλοιώσεις	Πολλαπλές Διακριτές Αλλοιώσεις	Υπο καθοδήγηση μαγνητικού τομογράφου	Υπο Υπέρηχ. καθοδήγηση
1	✓	✓	✓	PILOT υπερήχου				
2	✓	✓	✓	PILOT μαγνητικού τομογράφου				
3	✓	✓	✓	✓				✓
4	✓	✓	✓	✓				✓
5	✓	✓	✓	✓				✓
6	✓	✓	✓	✓				✓
7	✓	✓	✓	✓				✓
8	✓	✓	✓	✓			✓	
9	✓	✓	✓		✓			✓
10	✓	✓	✓		✓			✓
11	✓	✓	✓		✓			✓
12	✓	✓	✓		✓			✓
13	✓	✓	✓		✓			✓
14	✓	✓	✓		✓			✓
15	✓	✓	✓			✓	✓	
16	✓	✓	✓			✓		✓
17	✓	✓	✓			✓		✓
18	✓	✓	✓			✓		✓
19	✓	✓	✓			✓		✓
20	✓	✓	✓			✓	✓	

Βάσει βιβλιογραφίας η βέλτιστη συχνότητα είναι κοντά στο 1 MHz. Αυτό μειώνει σημαντικά τον αριθμό των ζώων που θα χρησιμοποιηθούν.

Κάνοντας πειράματα και στα 3 ζωτικά όργανα αυτό αποφέρει επιπρόσθετη μείωση κατά 66 % στα ζώα.

Βελτιστοποίηση

- Λαμβάνοντας υπόψη τους στόχους του έργου εξηγήστε την επιλογή σας ως προς το είδος, το/τα πρότυπο(-α) και τη/τις μέθοδο(-ους). Εξηγήστε για ποιο λόγο είναι τα πλέον ενδεδειγμένα για τον προβλεπόμενο σκοπό
- Τι μέτρα θα εφαρμοστούν ώστε τα ζώα να υποβληθούν στη μικρότερη δυνατή ταλαιπωρία; Παρέχετε ειδική αιτιολόγηση για τυχόν διαδικασίες υψηλής δριμύτητας.

(Η αιτιολόγηση να γίνει βάσει επιστημονικών δεδομένων και σχετικών βιβλιογραφικών αναφορών).

Θα χρησιμοποιήσουμε κουνέλια Κυπριακής εκτροφής, τα οποία θα είναι ενήλικα 1-2 χρονών τα οποία έχουν ικανοποιητικά μεγάλο σώμα (σωματικό βάρος >3.5 kg) ώστε τα αποτελέσματα των πειραμάτων να προσεγγίζουν όσο το δυνατόν καλύτερα συνθήκες σε ανθρώπους για μελλοντική επέκταση του συστήματος σε περισσότερες εφαρμογές. Τα πρωτόκολλα θεραπευτικών υπερήχων θα δοκιμαστούν στο ήπαρ, τον νεφρό

και το πάγκρεας του ζώου, υπο καθοδήγηση MRI ή υπερήχου. Τα κουνέλια αποτελούν ιδανικό μέγεθος μοντέλου, καθώς τα ποντίκια είναι μικρά σε μέγεθος για αυτή την εφαρμογή, ενώ μεγαλύτερα ζώα κρίνονται αντισυμβατικά.

Η εφαρμογή της τεχνικής θα υλοποιείται με το κουνέλι να βρίσκεται υπο γενική αναισθησία και με την χορήγηση κατάλληλης αναλγησίας. Η εν λόγω πειραματική μέθοδος με την χρήση θεραπευτικών υπερήχων είναι μη επεμβατική. Εντούτοις, σε περίπτωση που η διεύθυνση της δέσμης δεν είναι ικανοποιητική, η τεχνική θα επαναλαμβάνεται με ανοικτή τεχνική (ενδοπεριτοναϊκά). Ακολούθως μετά την ολοκλήρωση του πειράματος το ζώο θα θανατώνεται με ευθανασία και επομένως η μόνη δυσφορία που θα υποβάλλεται θα είναι ο μικροτραυματισμός από την βελόνα κατά την διαδικασία της αναισθησίας.

Τα πειράματα θα γίνουν από κατάλληλα εκπαιδευμένο και έμπειρο ερευνητικό προσωπικό κάτω από την επίβλεψη κτηνιάτρου (Δρ. Κυριάκο Σπανούδη).

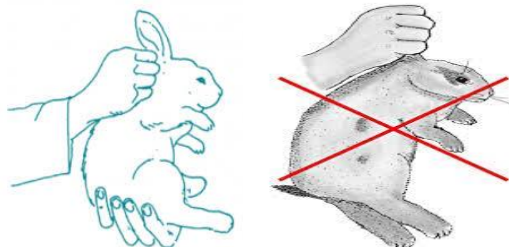
4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Μια διαδικασία περιλαμβάνει μια σειρά από τεχνικές οι οποίες εκτελούνται σε ομάδα ζώων για συγκεκριμένο σκοπό και εκτείνεται από τη χρονική στιγμή της εφαρμογής της πρώτης τεχνικής στο ζώο μέχρι την ολοκλήρωση της συλλογής δεδομένων και των παρατηρήσεων ή την επίτευξη του εκπαιδευτικού στόχου (μέχρι τη θανάτωση ή απελευθέρωση του ζώου).

Να γίνει αναλυτική περιγραφή όλων των διαδικασιών (συμπεριλαμβανομένης και κάθε τεχνικής) για κάθε πειραματική ομάδα, συμπεριλαμβανομένων και των ομάδων ελέγχου, βάση χρονοδιαγράμματος (ημέρα/ ώρα, ανάλογα με τη διάρκεια της διαδικασίας, όπου θα γίνεται σαφής η αλληλουχία και η συχνότητα των διαδικασιών και τεχνικών (π.χ. ημέρα 1: ζύγιση, αιμοληψία Α, ημέρα 8: ζύγιση, αιμοληψία Β, ημέρα 16: ζύγιση, αιμοληψία, ευθανασία και δειγματοληψία).

Χειρισμός των ζώων

Τα γάντια θα πρέπει πάντα να φοριούνται όταν χειρίζονται Ζώα. Αυτά τα ζώα μπορούν να γίνουν νευρικά και να προκαλέσουν σοβαρά τσιμπήματα ή γρατσουνιές από τα ισχυρά οπίσθια άκρα τους, αν δεν έχουν υποστεί σωστό χειρισμό και συγκράτηση. Ο χειρισμός των κουνελιών πρέπει πάντοτε να γίνεται με σεβασμό της ευζωίας τους, ώστε να μην προκαλείται άσκοπος πόνος, ταλαιπωρία και φόβος. Τα κουνέλια δεν πρέπει ποτέ να χειρίζονται από τα αυτιά λόγω της υψηλής πιθανότητας πρόκλησης εξάρθρωσης της σπονδυλικής στήλης και να προκληθεί θάνατος. Θα πρέπει να κρατιούνται κρατώντας το χαλαρό δέρμα πάνω από τους ώμους με το ένα χέρι και είτε στηρίζοντας ή πιάνοντας τα πίσω πόδια με το άλλο χέρι. Εάν δεν στηριχθούν ή κρατηθούν τα πίσω πόδια, μπορεί να προκληθεί προσπάθεια απόδρασης του ζώου, κάτι που μπορεί να προκαλέσει σοβαρό τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης.



Προεγχειρητική νηστεία

Η προεγχειρητική νηστεία δεν είναι απαραίτητη επειδή δεν έχει αναφερθεί έμετος κατά την επαγωγή αναισθησίας σε μικρά ζώα. Τα κουνέλια υπόκεινται σε αφυδάτωση, οπότε πρέπει να έχουν πάντα άφθονο νερό. Αυτά τα ζώα θα έχουν πρόσβαση σε νερό μέχρι περίπου 60 λεπτά πριν από την έναρξη της αναισθησίας.

Πριν την έναρξη των πειραμάτων θα χορηγείται στα κουνέλια, γεννική αναισθησία και αναλγησία. Η θεραπεία θα πραγματοποιείται με το σύστημα υπερήχων. Η ισχύς που θα χρησιμοποιείται θα είναι από 10-

80 W. Η διάρκεια κάθε ριπής υπερήχων θα είναι 1-60 s. Αυτή η θερμοκρασία θα δημιουργεί νέκρωση του ιστού. Λόγω της γεωμετρίας της πηγής υπερήχων η δόση των υπερήχων θα παραμένει μόνο μέσα στον στόχο. Θα δοκιμαστεί καινοτόμο σύστημα ρομποτικής. Μετά το πείραμα στο ζώο θα γίνεται ευθανασία.

Το ζώο θα βρίσκεται υπο γενική αναισθησία και υπο συνεχή κτηνιατρική παρακολούθηση. Θα χορηγείται συνδυασμός Κεταμίνης (15 mg/kg) με Μεδετομιδίνη (0.25-0.50 mg/kg SC). Για αναλγησία θα χορηγείται Βουτορφανόλη (0.4 mg/kg SC)

Επιλογή Ζώου

Η επιλογή ενός υγιούς μεγάλου ζώου μεγαλύτερου από 3,5 κιλά προσδίδει σε ένα πειραματικό αντικείμενο με καλή ικανότητα να αντέχει στη διαδικασία. Το φύλο δεν αποτελεί κριτήριο επιλογής, αλλά πιο προσβάσιμα είναι θηλυκά κουνέλια μετά το πέρας της αναπαραγωγικής τους ζωής.

Ξύρισμα δέρματος

Πριν την έναρξη των πειραμάτων θα ξυρίζονται με αφρό από το την περιοχή ηχοβόλησης όλες οι τρίχες ώστε να μπορούν να μεταδοθούν οι θεραπευτικοί υπέρηχοι.

Χώρος διεξαγωγής πειραμάτων

Τα πειράματα θα διεξάγονται στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου θεραπευτικών υπερήχων (ΣΤΟΑ ΛΑΝΙΤΗ) του **Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου**.

Εξαγωγή δειγμάτων ιστού.

Μετά το τέλος της απεικόνισης θα εξάγονται δείγματα ιστού με την θεραπεία για ιστολογικές εξετάσεις (H &E) ή φωτογράφιση.

Διάρκεια πειραμάτων

4 μήνες απο την ημερομηνία έγκρισης του πρωτοκόλου (εκριση αναμένεται αρχές Απριλλίου).

Χρήση αναλγητικών φαρμάκων

Προβλέπεται η χρήση βουτορφανόλης, καθώς η ηχοβόληση ζωτικών οργάνων αναμένεται να προκαλέσει ιστική βλάβη και πόνο.

Αριθμός πειραμάτων

Υπολογίζεται να διεξαχθούν περίπου 20 πειράματα σε κουνέλια σε αυτό το πρόγραμμα.

Διάρκεια πειραμάτων

Η διάρκεια του πειράματος θα είναι γύρω στις 3 ώρες.

Επίβλεψη κτηνιάτρου

Στα πειράματα θα συμμετέχει ο αδειούχος κτηνίατρος Κυριάκος Σπανούδης με τα πιο κάτω καθήκοντα:

- 1) Εφαρμογή και επίβλεψη αναισθησίας και αναλγησίας
- 2) Παρακολούθηση κατά την διάρκεια της διαδικασίας κατά πόσο το ζώο υποφέρει κατά την διάρκεια του θεραπευτικού πρωτοκόλλου με υπέρηχους. Αν το ζώο υποφέρει (από την πείρα μας δεν έχει συμβεί ποτέ) τότε ο κτηνίατρος θα αυξήσει το βάθος αναισθησίας και αναλγησίας. Σε περίπτωση που και αυτό το μέτρο δεν επαρκεί για έλεγχο του πόνου, και η δριμύτητα είναι βαριά, στο ζώο θα γίνεται άμεσα ευθανασία για λόγους ευζωίας.
- 3). Ευθανασία του ζώου. Μέθοδος: Ενδοφλέβια ή ενδοκαρδιακή χορήγηση χλωριούχου κάλιου ή άλλου σκευάσματος (T61) εν μέσω τις αναφερόμενης αναισθησίας.

Επιπρόσθετα το κόστος του κουνελιού είναι χαμηλό καθώς και το κόστος διεξαγωγής του πειράματος. Επίσης το κόστος της δημιουργίας εργαστηρίου για πειράματα σε κουνέλια είναι χαμηλό, αφού απαιτείται απλά ένα τραπέζι διαστάσεων 1 μέτρο x 1 μέτρο για να τοποθετείται το κουνέλι και 4 μικρά μηχανήματα τα οποία αποτελούν το σύστημα υπερήχων (εικόνα 5). Τα ζώα τα οποία εκτρέφονται για την αγορά, θα

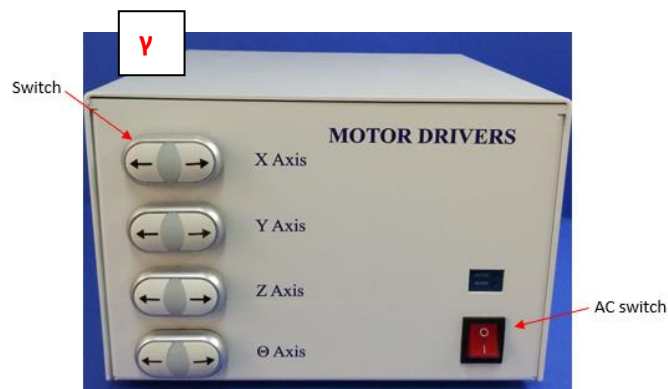
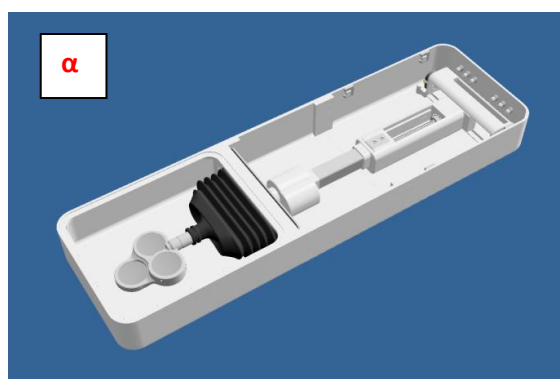
προέρχονται από εγκεκριμένη φάρμα. Τα ζώα δεν απαιτείται να ακολουθήσουν οποιαδήποτε δίαιτα. Τα ζώα θα μεταφέρονται μέσα σε κατάλληλο κλουβί (κλουβί μεταφοράς κατοικιδίων)

Τα θανατωμένα κουνέλια θα παραδίδονται στην εταιρία Sigan management Ltd (24-817490) η οποία έχει άδεια για περισυλλογή απόβλητων.

Πειραματική διαδικασία

0-30 λεπτά	Αξιολόγηση του Ζώου (κατάσταση, βάρος)
30-45 λεπτά	Χορήγηση αναισθησίας
45-150 λεπτά	Διεξαγωγή πειράματος
150-165 λεπτά	Ευθανασία
165-180 λεπτά	Λήψη δείγματος

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Από την αρχή μέχρι το τέλος το ζώο θα είναι κάτω από αναισθησία και αναλγησία και επομένως δεν αναμένεται να υπάρξει πόνος.



Εικόνα 5: Στην ποιο πάνω εικόνα φαίνεται το ρομποτικό σύστημα 3^{ων} βαθμών ελευθερίας (α), η γεννήτρια σημάτων μαζί με τον ενισχυτή (β), και το ηλεκτρονικό ελέγχου κίνησης του ρομποτικού συστήματος (γ).

Για περισσότερες από μια διαδικασίες προσθέστε ανάλογο πίνακα.

Τίτλος:	MRI-guided robotic system for non-invasive focused ultrasound surgery.
Κατάταξη δριμύτητας(*):	☒ Ήπια (SV1) ☐ Μέτρια (SV2) ☐ Βαριά (SV3) ☐ Χωρίς ανάνηψη (SV4)
Είδος ζώου:	Κουνέλια Κύπρου που αποσύρονται απο την αναπαραγωγή και βρίσκονται στα τελευταία στάδια της ζωής τους.
Στάδιο ζωής των ζώων:	Κουνέλια: Ενήλικα 1-2 χρονών για να έχουν μεγάλο σώμα
Είναι γενετικά τροποποιημένα:	☒ Όχι (GS1) ☐ Ναι Αν ναι: Η τροποποίηση αυτή προκαλεί πρόβλημα στην ευζωία του ζώου; ☐ Όχι – γενετικά τροποποιημένα ζώα χωρίς επιβλαβή φαινότυπο (GS2) ☐ Ναι – γενετικά τροποποιημένα ζώα με επιβλαβή φαινότυπο (GS3)
Αριθμός ζώων που αναμένεται να χρησιμοποιηθούν:	20
Τόπος γέννησης:	☐ Εντός ΕΕ σε καταχωρημένο εκτροφέα (O1)..... Καταγωγή κουνελιών: Κύπρος Τα κουνέλια θα προμηθεύονται από την εγκεκριμένη φάρμα κουνελιών του Σωτηρη Ιωαννου (Κ. Πολεμίδια, τηλ. 99-402776, Αρ. εκμετάλλευσης CYCU5.05. ☐ Εντός ΕΕ, σε μη καταχωρημένο εκτροφέα (O2)..... ☐ Στην υπόλοιπη Ευρώπη (O3)..... ☐ Εκτός Ευρώπης (O4).....
Δηλώστε εάν τα ίδια ζώα έχουν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενο έργο (επαναχρησιμοποίηση)- Παρέχετε σχετική αιτιολόγηση	Δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ξανά
Αρνητικές επιπτώσεις στα ζώα, πρόληψη και ελαχιστοποίηση κάθε μορφής ταλαιπωρίας του ζώου και χρήση πρώιμων μη βάνουσων καταληκτικών σημείων Δεν είναι αναγκαίο να αναφερθούν αναλυτικά οι λιγότερο συνήθεις ή σπάνιες αρνητικές επιπτώσεις ή οι επιπτώσεις των διαδικασιών που προκαλούν μόνο προσωρινή ήπια ενόχληση και όχι μόνιμη βλάβη, για παράδειγμα μια ενδοφλέβια ένεση.	

- Για κάθε διαδικασία (τεχνική) περιγράψτε τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις και την αναμενόμενη συχνότητα εμφάνισης στα ζώα.
- Περιγράψτε τον τρόπο παρακολούθησης και αξιολόγησης της καλής διαβίωσης των ζώων και της εμφάνισης ή εξέλιξης των επιπτώσεων αυτών.

Θα χορηγήσουμε φάρμακα για αναισθησία. Αυτό θα αποφέρει μικροτραυματισμό.
Μετά το πείραμα, το ζώο θα θανατώνεται.

- Τα μέτρα που θα ληφθούν για την πρόληψη ή ελαχιστοποίηση τους.
- Προγραμματισμένη χρήση αναισθητικών, αναλγητικών και άλλων μεθόδων για την ανακούφιση του πόνου.

Προβλέπεται η χρήση αναισθησίας ;

☒ Ναι

Εάν ναι δώστε λεπτομερή περιγραφή της αγωγής, συμπεριλαμβανομένων των ουσιών, δοσολογίας και μέθοδο χορήγησης.

Στο ζώο που θα είναι μέρος του πειράματος θα βρίσκεται υπο γενική αναισθησία και αναλγησία, και υπο συνεχή κτηνιατρική παρακολούθηση.

Για την αναισθησία θα χρησιμοποιηθεί πρωτόκολο με συνδυασμό
Μεδετομιδίνη (0.25-0.50 mg/kg), κεταμίνη (0.15 mg/kg) υποδορίως

Επειδή τα κουνέλια δεν κάνουν εμετό δεν απαιτείται νηστεία πριν το πείραμα.

☐ Όχι

Εάν όχι εξηγήστε τους λόγους.

Προβλέπεται η χρήση αναλγητικών ή άλλων μεθόδων ανακούφισης από τον πόνο;

☒ Ναι

Εάν ναι δώστε λεπτομερή περιγραφή της αγωγής, συμπεριλαμβανομένων των ουσιών, δοσολογίας και μέθοδο χορήγησης.

☐ Όχι

Εάν όχι εξηγήστε τους λόγους.

Θα χρησιμοποιηθεί βουτορφανόλη (0.4 mg/kg) υποδορίως

- Εξετάσατε άλλες μεθόδους στέγασης και φροντίδας ως μέσο για τη μείωση του πόνου, της ταλαιπωρίας ή της αγωνίας (π.χ. μαλακή στρωμένη και παροχή της τροφής στο δάπεδο του κλωβού σε μελέτες σχετικές με την αρθρίτιδα;)

Τα κουνέλια εκτρέφονται για την αγορά κρέατος. θα προέρχονται από εγκεκριμένη φάρμα. Τα κουνέλια δεν απαιτείται να ακολουθήσουν οποιαδήποτε νηστεία. Τα ζώα θα μεταφέρονται μέσα σε κατάλληλο κλουβί με μέγεθος για κουνέλια (κλουβί μεταφοράς κατοικιδίων)

- Σε κάθε περίπτωση τα εφαρμόσιμα και ρεαλιστικά πρώιμα μη βάνουσα καταληκτικά σημεία (ευθανασία).

Εάν το καταληκτικό σημείο είναι ο θάνατος, διευκρινίστε για ποιον λόγο είναι αναγκαίος και ποιά μέτρα έχουν ληφθεί για την ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων στα ζώα

- Απαιτείται λήψη ιστών μέτρηση της έκτασης της νέκρωσης, συνεπώς η θανάτωση επιβάλλεται.
- Η θερμική καταστροφή σε ζωτικά όργανα και πιθανόν να μην είναι συμβατή με καλή λειτουργία των οργάνων.
- Για να αποφευχθεί αχρείαστος πόνος μετά την ανάνηψη.

Τύχη των ζώων μετά το τέλος της διαδικασίας

☒	Ευθανασία
	Μέθοδος επιλογής: Ενδοφλέβια ή ενδοκαρδιακή χορήγηση χλωριούχου κάλιου ή άλλου σκευάσματος (T61) εν μέσω τις αναφερόμενης αναισθησίας.
☐	Επαναχρησιμοποίηση σε άλλο έργο με προτεινόμενη δριμύτητα των διαδικασιών:
	☐ Ήπια ☐ Μέτρια ☐ Χωρίς ανάνηψη
	Παρέχετε σχετική αιτιολόγηση, εξηγήστε τους περιορισμούς και τον τρόπο με τον οποίο θα ληφθούν οι αποφάσεις.
☐	Άλλο-(Καθορίστε)

5. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΥΠΟΣΤΑΤΙΚΟΥ

Αριθμός άδειας Υποστατικού Χρήσης	CYCU5.05
Συνθήκες στέγασης, ζωοτεχνίας και φροντίδας των ζώων	
• Περιγράψτε τις συνθήκες στέγασης και φροντίδας των ζώων και του εξοπλισμού. • Περιγράψτε και αιτιολογήστε τυχόν μείωση των ελάχιστων προτύπων στο παράρτημα III, π.χ. μεμονωμένη στέγαση.	
Τα κουνέλια τα οποία εκτρέφονται για την αγορά, θα προέρχονται από εγκεκριμένη φάρμα. Θα μεταφέρονται στο εργαστήριο όπου βρίσκεται ο εξοπλισμός στις εγκαταστάσεις των θεραπευτικών υπερήχων (ΣΤΟΑ ΛΑΝΙΤΗ) του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων θα συμμετέχει αδειούχος κτηνίατρος για την χορήγηση αναισθητικού και να διασφαλίσει πως το ζώο δεν υποφέρει.	

6.ΜΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Συμπληρώστε τα ακόλουθα σε απλή γλώσσα και χωρίς αναφορά σε τεχνικές λεπτομέρειες. Η μη τεχνική περίληψη δημοσιεύεται από την αρμόδια αρχή στα πλαίσια της πληροφόρησης της κοινής γνώμης. Για περαιτέρω διευκρινήσεις ακολουθήστε τον [σύνδεσμο](#).

Τίτλος του έργου	Ρομποτικό σύστημα θεραπευτικών υπερήχων με καθοδήγηση μαγνητικού τομογράφου για προκλινική έρευνα
Διάρκεια του έργου	4 μήνες
Λέξεις ευρετηριασμού	
Σκοπός του έργου	☒ Βασική έρευνα ☒ Μεταγραφική ή εφαρμοσμένη έρευνα

	☐ Κανονιστική χρήση (χρήση στο πλαίσιο νομοθετικών απαιτήσεων) ☐ Προστασία του φυσικού περιβάλλοντος με γνώμονα την υγεία ή την καλή διαβίωση ανθρώπων ή ζώων ☐ Έρευνα με σκοπό τη διατήρηση ζωικών ειδών ☐ Εκπαίδευση ή κατάρτιση για την απόκτηση, διατήρηση ή βελτίωση των επαγγελματικών δεξιοτήτων ☐ Ιατροδικαστικές έρευνες ☐ Διατήρηση γενετικά τροποποιημένων ζώων που δεν χρησιμοποιούνται σε άλλα πρωτόκολλα
Περιγραφή των στόχων του έργου (π.χ τι είναι επιστημονικά άγνωστο ή ποιές είναι οι επιστημονικές/κλινικές ανάγκες)	Νέκρωση ιστού με θερμικούς υπερήχους σε ζωντανά κουνέλια ώστε να αξιολογήσουμε τις δυνατότητες της πηγής υπερήχων και του ρομποτικού συστήματος. Τα αποτελέσματα που θα παρθούν θα είναι χρήσιμα και σε μεταγενέστερο στάδιο όπου θα επεκτείνουμε τις εφαρμογές του συστήματος σε πιθανές εφαρμογές σε ανθρώπους.
Ποιά οφέλη αναμένονται από την υλοποίηση του συγκεκριμένου έργου (σε σχέση με τον άνθρωπο, τα ζώα ή το περιβάλλον)	Το έργο θα αναδείξει αν η θεραπεία με θερ. Υπέρηχους σε συνδυασμό με ρομποτικό σύστημα και απεικόνιση μαγνητικού τομογράφου θα προσφέρεται ως εναλλακτική για ογκολογικές εφαρμογές στην κοιλιακή χώρα. Αυτά τα πειράματα θα συμβάλουν στην απόκτηση επιπλέον δεδομένων για πιθανές κλινικές εφαρμογές σε μεταγενέστερο στάδιο για θεραπεία διαφόρων ασθενειών με μη επεμβατικά μέσα.
Είδος και συνολικός αριθμός ζώων που αναμένεται να χρησιμοποιηθούν στη διάρκεια του έργου	Κουνέλια Κύπρου, ενήλικα 1-2 χρονών (σωματικό βάρος > 3.5 kg) για να έχουν μεγάλο σώμα. Ο αριθμός των κουνελιών που αναμένεται να χρησιμοποιηθούν είναι 20.
Στο πλαίσιο υλοποίησης του έργου α. ποιές είναι οι αναμενόμενες δυσμενείς επιπτώσεις στα ζώα, β. ποιά θα είναι το εκτιμώμενο επίπεδο δριμύτητας των διαδικασιών καθώς και γ. ποιά η τύχη των ζώων μετά την υλοποίηση του έργου; <i>Να αναφερθεί το υψηλότερο εκτιμώμενο επίπεδο δριμύτητας και το ποσοστό των ζώων που αναμένεται να το υποστούν</i>	Θα χορηγήσουμε φάρμακα για αναισθησία. Αυτό θα αποφέρει μικροτραυματισμό. Μετά το πείραμα, το κουνέλι θα θανατώνεται. Το επίπεδο δριμύτητας θα είναι χαμηλό αφού ο θεραπευτικός υπέρηχος χορηγείται στο ζώο εβρισκόμενο υπο γενική αναισθησία και κατόπιν χορήγησης αναλγησίας.
Οι αρχές των 3R	
Αντικατάσταση (Replacement) Γιατί είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση ζώων και όχι κάποια άλλη εναλλακτική μέθοδος πειραματισμού που δεν χρησιμοποιεί ζώα;	Για να γίνει θεραπεία με υπέρηχους χρειάζεται ζωντανός ιστός ώστε στο πείραμα να υπάρχει ροή αίματος και ώστε η ακουστική εξασθένηση να είναι κοντά στην εξασθένηση ανθρώπινων ιστών.
Μείωση (Reduction) Τι μέτρα θα εφαρμοστούν ώστε να χρησιμοποιηθεί ο μικρότερος αριθμός ζώων χωρίς να επηρεαστούν τα ερευνητικά αποτελέσματα;	Η μείωση των ζώων επιτυγχάνεται με την χρήση πειραμάτων in vitro που περιγράφονται πιο κάτω. Πριν διενεργήσουμε πειράματα σε ζώα θα αξιολογηθούν τα πιο κάτω σε πειράματα in vitro:

	A) Η κίνηση του ρομποτικού συστήματος θα δοκιμαστεί με την χρήση πλασματικών υλικών (phantoms). Τα πλασματικά υλικά θα αποτελούνται από αγαρόζη (μιμείται ιστο). B) Επιπλέον θα πραγματοποιηθούν πειράματα σε ιστό κρέατος με σκοπό την αξιολόγηση της ικανότητας του συστήματος να προκαλέσει θερμική νέκρωση. Σε αντίθεση με τα πλασματικά υλικά τα οποία είναι ομοιογενή και η δέσμη του υπερήχου ταξιδεύει χωρίς εμπόδια. Προκαλώντας θερμικές νεκρώσεις σε νεκρό ιστό θα μπορέσουμε να εντοπίσουμε και να προσαρμόσουμε το πρωτόκολλο των θεραπευτικών υπερήχων καλύτερα για τα πειράματα που θα ακολουθήσουν στα κουνέλια/κατοικίδια ζώα.
Βελτίωση (Refinement) Λαμβάνοντας υπόψη τους στόχους του έργου εξηγήστε την επιλογή σας ως προς την επιλογή σας ως προς το είδος, το/τα πρότυπο(-α) και τη/τις μέθοδο(-ους). Εξηγήστε για ποιο λόγο είναι τα πλέον ενδεδειγμένα για τον προβλεπόμενο σκοπό. Τι μέτρα θα εφαρμοστούν ώστε τα ζώα να υποβληθούν στη μικρότερη δυνατή ταλαιπωρία;	Κουνέλια Κύπρου, ενήλικα 1-2 χρονών για να έχουν μεγάλο σώμα και συνεπώς μεγάλο σωματικό όγκο με σκοπό τα αποτελέσματα των πειραμάτων να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικά σε σχέση με τους ανθρώπους. Επιπλέον τα πειράματα σε κουνέλια έχουν χαμηλό κόστος γιατί δεν χρειάζεται εξειδικευμένος εξοπλισμός, αλλά μόνο το ρομποτικό σύστημα και ένα τραπέζι όπου και θα τοποθετηθούν. Επίσης η αναισθησία στα κουνέλια είναι αρκετά πιο εύκολη και απλή. Θα προμηθευόμαστε τα κουνέλια από εγκεκριμένη φάρμα ενώ δεν υφίσταται ανάγκη για κάποια δίαιτα ή κάποια προετοιμασία των κουνελιών για τα πειράματα.

Ο αιτών /Η αιτούσα

Χριστάκης Δαμιανού
Όνομα ολογράφως


Υπογραφή

3/3/2020
Ημερομηνία