

# A modulált elektrohipertermia (mEHT) indukálta tumorkárosodás mechanizmusa kolorektális karcinóma modellben

KRENÁCS TIBOR<sup>1</sup>, MEGGYESHÁZI NÓRA<sup>1</sup>, KÖVÁGÓ CSABA<sup>3</sup>, KISS ÉVA<sup>1</sup>, FORIKA GERTRUD<sup>1</sup>, BALOGH ANDREA<sup>2</sup>, VANCsik TAMÁS<sup>1</sup>

Semmelweis Egyetem, <sup>1</sup>I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, <sup>2</sup>Onkológiai Központ, <sup>3</sup>Szent István Egyetem, Állatorvostudományi Kar, Farmakológiai és Toxikológiai Intézet, Budapest

## Levezetési cím:

Krenács Tibor, PhD, Habil., D.Sc., Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest, Üllői út 26. Tel.: 20 825 9700; e-mail: krenacst@gmail.com

## Közlésre érkezett:

2019. november 4.

## Elfogadva:

2019. november 14.

A modulált elektrohipertermia (mEHT) egy nem invazív daganatkezelési eljárás, melynél a 13,56 MHz rádiófrekvenciás elektromos tér szignifikánsan feldúsul a malignus daganatokban a környező normális szövetekhez képest. A hatás alapja a daganatok megváltozott metabolizmusa, vagyis hogy oxidatív körülmények között is fokozott glikolízist folytatnak (Warburg-hatás), amit emelkedett tejsav- és ionkoncentráció kísér. Az így kialakult fokozott vezetőképesség és a dipólus molekulák dielektromos polarizációja és súrlódása révén a „core”-hőmérséklet emelkedését okozza a tumorban, ami a kezelőberendezéssel 42 °C-on stabilizálható. Az mEHT komplementer alkalmazása javítja a kemo-, radio- és újabban a molekuláris célpontú immunológiai kezelések hatékonyságát, a lokális perfúzió és xenobiotikus koncentráció növelése, a tumorhipoxia oldása, valamint a magas láz tartományú hipertermia immunfelügyeletet támogató hatásai miatt. Korábban igazoltuk, hogy az mEHT-kezelés önmagában is rendelkezik tumorgátló/-destruáló hatással, de ennek mechanizmusa nem volt tisztázott. Kutatásaink *in vitro* és *in vivo* kolorektális karcinóma modellek alkalmazásával a molekuláris hatásmechanizmus jobb megismerését célozzák. *Magy Onkol* 63:359-364, 2019

**Kulcsszavak:** modulált elektrohipertermia, C26 kolorektális adenokarcinóma, apoptózis, károsodási (DAMP) szignálok, immunogén sejtihalál, szisztémás abszkopális hatás

*Modulated electro-hyperthermia (mEHT) is a non-invasive treatment modality of cancer where electric field generated by 13.56 MHz radiofrequency can selectively accumulate in malignant tumors compared to adjacent normal tissues. This effect is based on the metabolic shift in cancer cells which upregulates glycolysis even under oxygenated conditions (Warburg effect), resulting in elevated lactate and ion concentration. The concomitant increased permittivity can induce dielectric polarization and rotational friction of dipole molecules resulting in elevated core temperature, which can be controlled at 42 °C with the treating instrument. Complementary application of loco-regional mEHT can improve the efficiency of chemo-, radio- and recently molecular targeted therapies based on increasing local perfusion and xenobiotic concentration, resolving tumor hypoxia and improved immune surveillance supported by high-fever range hyperthermia. We earlier showed that mEHT has its own tumor inhibiting/destructing effect, however, its mechanism had not been clarified. In this project we have investigated the molecular mechanism of action of mEHT treatment using *in vitro* and *in vivo* models of colorectal adenocarcinoma.*

*Krenács T, Meggyesházi N, Kövágó C, Kiss É, Forika G, Balogh A, Vancsik T. Mechanism of action of modulated electro-hyperthermia (mEHT) induced tumor damage in colorectal adenocarcinoma models. Magy Onkol 63:359-364, 2019*

**Keywords:** modulated electro-hyperthermia, C26 colorectal adenocarcinoma, apoptosis, damage associated molecular pattern (DAMP) signaling, immunogenic cell death, systemic abscopal effect

## BEVEZETÉS

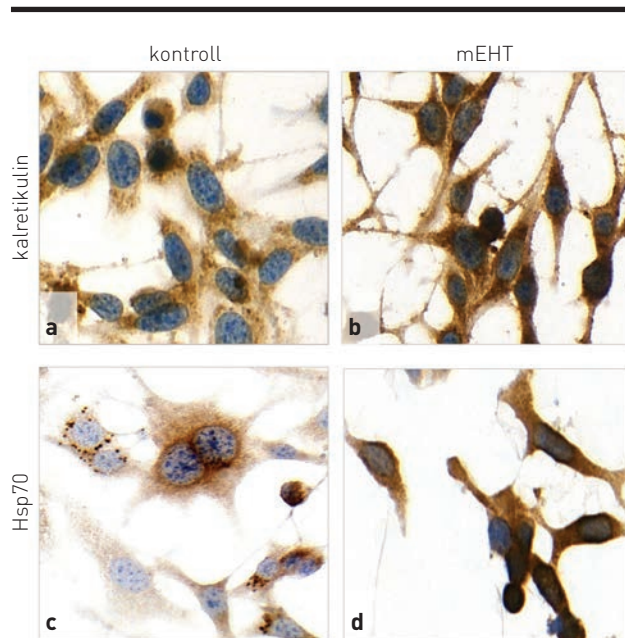
A kolorektális adenokarcinóma világszerte az egyik vezető daganatos halálok, ami becslések szerint több mint 1,2 millió új megbetegedést okoz évente [1, 2]. A daganatok legalább 50%-a távoli áttét nélkül kiújul sebészi eltávolítás után, míg 20%-uk már távoli metasztázissal kerül felismerésre [3]. Bár a lokalizált daganatok 5 éves túlélése ~90%, a távoli áttétes kolorektális rákkal diagnosztizált eseteké ennek töredéke csupán, 12% [4]. Mivel a tradicionális kezelési lehetőségek esélyei – különösen áttétes daganatokban – alacsonyak, az utóbbi években a gazdaszervezet tumorelles immunválaszának támogatása immunellenőrzőpont-gátlók alkalmazásával került előtérbe [2, 5].

Korábban immundeficiens egerekben kialakított TP53-mutáns humán xenograft kolorektális karcinóma (HT29) modellben igazoltuk, hogy az mEHT-kezelés AIF1 (apoptózis-indukáló faktor-1) által közvetített programozott sejthalált okoz [6, 7]. A daganatpusztulás együtt járt a károsodásindukált molekuláris mintázatok (DAMP) felülregulációjával is, amit az éretlen T-sejtek és makrofágok felszaporodása kísért, utalva az immunogén sejthalál (ICD) [8, 9] lehetőségére mEHT-kezelés kapcsán. Az is régóta ismert, hogy a lázreakció a gerincesek túlélési előnyét jelentette az evolúció során a fertőzések és daganatok elleni hatékony immunfelügyelet miatt [10]. Magas láztartománynak megfelelő „core”-hőmérséklet-emelkedés lokoregionális mEHT-kezeléssel kontrollált körülmények között is kiváltható. Projektünkben az mEHT-kezelés daganatkárosító hatásmechanizmusát vizsgáljuk immunkompetens BALB/c egerekben kialakított C26 kolorektális adenokarcinóma allograftmodelljében, ill. *in vitro* sejtenyésztésben.

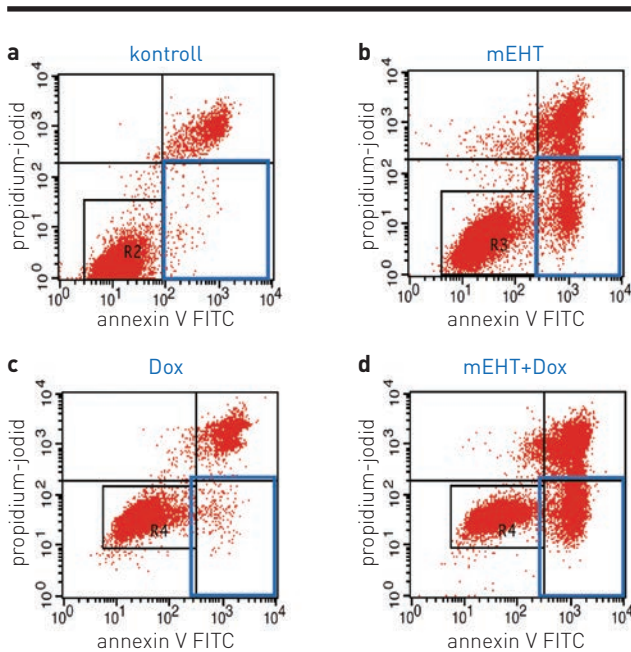
Az mEHT egy nem invazív, a kemo-, radio- és újabban az immunterápiát támogató komplementer daganatkezelési eljárás. A kezelés tumorszelektivitása a malignus daganatok megváltozott metabolizmusán alapul, fokozott glikolízisük kapcsán (Warburg-hatás) emelkedett tejsav- és ionkoncentráció miatt elektromos vezetőképességük megnő [11]. Hasonló elv, a fokozott glükózfelvétel alapján működik az FDG (18-fluordezoxiglükóz)-PET/CT eljárás. Az mEHT-kezelés során kapacitív kicsatolású 13,56 MHz-es rádiófrekvenciás elektromos térbe helyezett daganatrégió energiaabszorpciója nagyobb a normális szöveti környezethez képest, ami szelektív, 42 °C-on kontrollált hőhatást indukál. Ismert volt, hogy az mEHT-terápia hatása a lokális perfúzió és gyógyszer-koncentráció növelésének, a hipoxia csökkentésének, valamint az indukált irreverzibilis hő- és sejttressznek köszönhető a kezelt daganatokban. Azonban a kezelés hatásmechanizmusára vonatkozó molekuláris szintű információk csak töredékesen álltak rendelkezésre. A daganatsejt-pusztuláshoz vezető mEHT indukálta molekuláris válaszok feltárása támogathatja a nem invazív, elhanyagolható mellékhatásokkal járó mEHT-kezelés hatékonyabb kombinált alkalmazását kemo-, radio-, ill. molekuláris célpontú terápiás eljárásokkal.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

Sejtenyésztésben, ill. *in vivo* modellekben C26 egér kolorektális adenokarcinóma sejtvonal mEHT-kezelését végeztük legalább 5 párhuzamos mintában. A sejtvonal legfontosabb genetikai jellemzői: KRAS-mutáció (felülregulált GLUT1: Warburg-hatás), CDKN2A-deléció (p16<sup>ink4</sup>- és p14<sup>arf</sup>-dereguláció: csökkent p53-aktivitás), a KRT8 gén 23 nukleotidot érintő deléciója és hipermetiláció (magas vimentinexpreszió: hajlam epiteliális-mezenhimális átalakulásra); mikroszatellita-stabilitás (MSS), TP53-, ill. PTEN-vad típus. A háromdimenziós struktúra és az extracelluláris mátrix mikro környezet hiánya miatt *in vitro* modellben a szubkonfluens sejteket 2×60 percig, közte 120 perces szünettel, 42 °C-on kontrollálva kezeltük. *In vitro* mEHT+1 μM doxorubicin kombinált kezeléseket hatását is vizsgáltuk. Az *in vivo* modellben 6 hetes, immunkompetens BALB/c egerekben szimmetrikus allograft tumorokat hoztunk létre (10<sup>5</sup> tumorsejt injektálásával) az állatok hátsó végtagjainak femorális régiójában. 14 nap után, miután a daganatok átmérője elérte az 1,5 cm-t, a jobb oldali tumort 13,65 MHz-es radiofrekvenciás elektromos térbe helyezve 30 percig kezeltük, LabEHY100-as mEHT-beendezéssel (Oncotherm Kft., Budaörs) folyamatos bőrfelületi hűtés, valamint optikai hőszensorokkal a hőmérséklet ellenőrzése mellett. Teljesítmény és az energiaabszorpció visszacsatolásával a tumorban itt is 42 °C-on kontrolláltuk a hőmérsékletet, míg a kezelt bőrfelületen azt folyamatos hűtéssel 40 °C-on tartottuk, a rektális hőmérséklet pedig nem haladta meg a 38 °C-ot. A bal oldali tumorok hasonló beavatkozás, de kezelés nélkül kontrollként és a szisztémás



1. ÁBRA. Kalretikulin (a, c) és Hsp70 (b, d) chaperonfehérjék expressziójának jelentős emelkedése és citoplazmatikus transzlokációja C26 kolorektális adenokarcinóma tenyésztésben mEHT-kezelés hatására



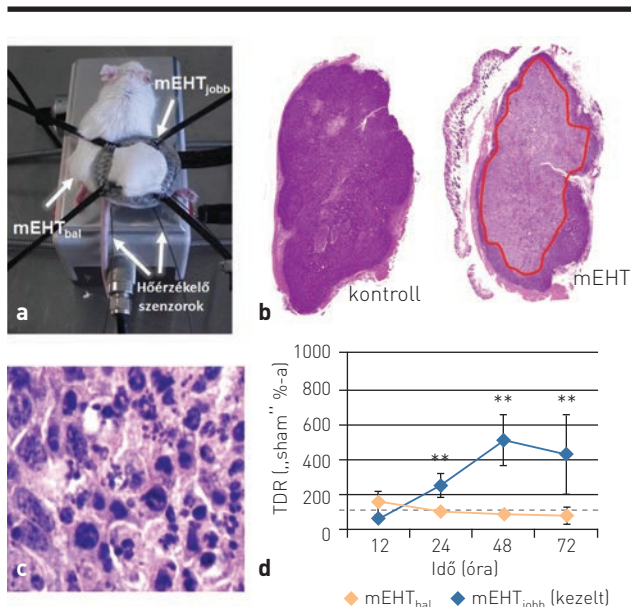
**2. ÁBRA.** Apoptózissal (annexin V-pozitív – kék keretben), ill. nekrotózissal (propidium-jodid-pozitív) pusztuló daganatsejtek aránya C26 kolorektális karcinóma kezeletlen (a), valamint mEHT-kezelt (b), doxorubicinkezelt (Dox) (c), ill. kombinált mEHT+Dox (d) kezelést kapott sejtenyészeteiben

hatás vizsgálatára szolgáltak. Ún. „sham” kontroll tumoros állatokat is alkalmaztunk, melyekkel az mEHT-kezelés kivételével mindenben azonos módon bántunk. A kezeléseket minden csoportban (ideértve a „sham” kontrollt is) legalább 5 állaton, az állatkísérletekre vonatkozó törvényi előírások betartásával, a megfelelő etikai engedélyk (No. Szie ÁOTK MAB 233/2012, ill. No. Szie ÁOTK MAB 26/2013) végeztük. Az állatokat 24, 48, ill. 72 órával a kezelés után túlaltatással feláldoztuk, az eltávolított tumorokat közepén megfeleztük, egyik részüket folyékony nitrogénben lefagyasztás után felhasználásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, másik részüket rutin formalinrögztítés után paraffinba ágyztuk. Immunhiszto/citokémiai, áramlási citometriai, Western-blot- és qPCR-vizsgálatokat végeztünk a sejttressz, programozott sejthalál, károsodásasszociált molekuláris mintázat (DAMP) szignálok, valamint immunsejttípusok azonosítására, életképességi és klonogén tesztek mellett.

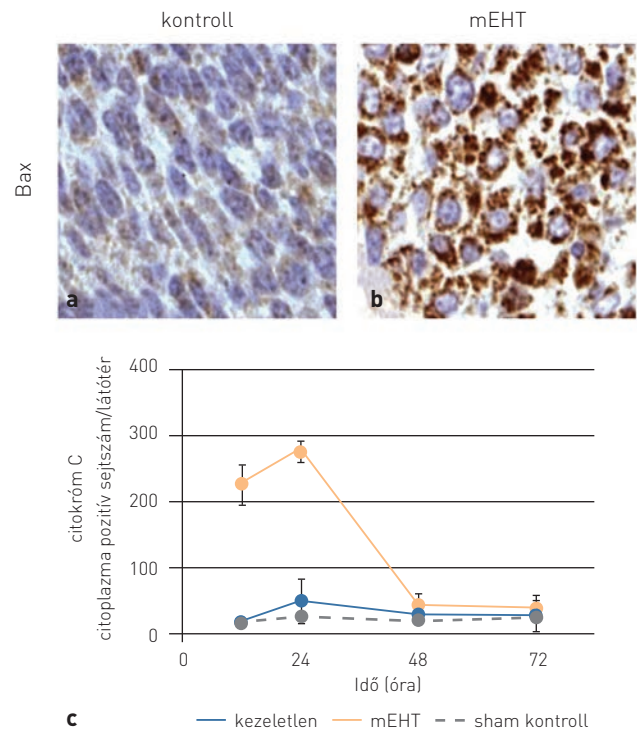
**EREDMÉNYEK**

**In vitro kezelés**

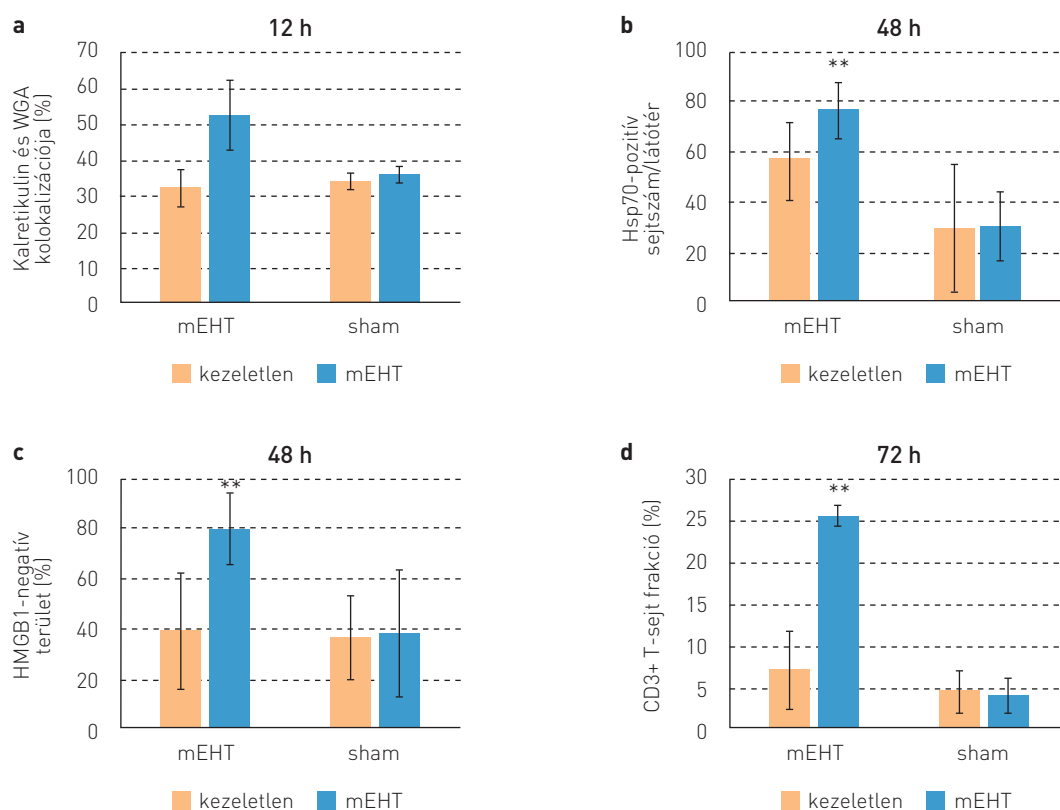
Az mEHT-kezelés szignifikánsan felülregulálta a sejttressz-asszociált Hsp70 és kalretikulín fehérjéket már 3 órával a kezelés után (1. ábra) [14].



**3. ÁBRA.** Az *in vivo* mEHT-kezelés kivitelezése (a), a tumordestrukciós arány (TDR) mérése digitális metszeten (b; piros keretben a károsodott terület), kromatinkondenzáció és apoptotikus testek felszaporodása (c), és a kezelés hatására szignifikánsan emelkedő TDR-értékek grafikus ábrázolása (d)



**4. ÁBRA.** A citoplazmatikus Bax fehérje transzlokációja a mitokondriumokba (a, b), és a citokróóm C kiszabadulása a mitokondriumokból (c) mEHT-kezelés hatására a belső (intrinsic) kaszpázjelút aktiválására utal



**5. ÁBRA.** mEHT-kezelés hatására felülregulált DAMP-szignálok és T-sejt-válasz. A kalretikulin protein dúsulása a WGA (búzacsíra-agglutinin) lektin pozitív sejtmembránokban (a), a Hsp70 fehérje citoplazmatikus felszaporodása (b), ill. a sejtmagi HMGB1 kijutása majd eltűnése a citoplazmából (c), valamint a CD3-pozitív T-sejtek következményes akkumulációja (d)

3–9 h között az antiapoptotikus XIAP, Bcl-2 és Bcl-xl mRNS-szintje jelentősen csökkent, míg a proapoptotikus Bax és PUMA, valamint a ciklinfüggő kináz gátló p21<sup>waf1</sup> szintje szignifikánsan emelkedett. 24 h után a foszforilált p53(Ser15) protein sejtmagi expressziója szignifikáns emelkedést mutatott a foszforilált Akt jelentős csökkenése mellett, amit számos tumorsejtben a programozott sejthalál út aktiválódására utaló hasított (aktivált) kaspáz-3 fehérje szintjének emelkedése kísért. Míg az mEHT-kezelés döntően apoptózist indukált, addig a doxorubicin-monoterápia alapvetően tumornekrózist váltott ki (2. ábra). Tíz nappal a beavatkozások után mind az mEHT-, mind a doxorubicinkezelés szignifikánsan gátolta az ős-/tumorprogenitor sejtklonok kifejlődését a kezeletlen kontrollokhoz képest. A két kezelés kombinációja pedig additívan csökkentette a tumorsejtek életképességét.

#### **In vivo kezelés**

Egér allograft tumorokban a lokoregionális mEHT-kezelés szignifikáns, progresszív tumorpusztulást indukált (3. ábra) (15). Már 24 órával a kezelést követően a daganatok cent-

rumából kiindulva megfigyelhetők voltak a programozott sejthalál morfológiai jegyei, a sejtmagok zsugorodása, bennük a kromatin kondenzációja és apoptotikus testek felszaporodása. A megnövekedett citoplazma/sejtmag arány miatt az apoptotikus területek halványabb hematoxilin-eozin festést adtak (eozintúlsúly), ami lehetővé tette a károsodott és a teljes tumorterületek arányának (TDR – tumordestrukción arány) pontos meghatározását digitális metszeteken.

A TDR a kezelés után többszöröse volt a spontán kialakult tumorkárosodásnak. Már a korai stádiumban a károsodott területeken a sejtciklus teljes leállítását a sejtmagi Ki67-pozitivitás teljes hiánya jelezte az egyébként >90%-os Ki67-indexet mutató daganatban. A fokozott tumorsejt-apoptózist a TUNEL-módszerrel végzett DNS-fragmentációs teszt is igazolta. A hasított/aktivált kaspáz-8- és kaspáz-3-pozitív tumorsejtek számának szignifikáns emelkedése igazolta, hogy a sejthalál döntően kaspázfüggő apoptózis mechanizmusával ment végbe. A citoplazmatikus Bax fehérje transzlokációja a mitokondriumokba, valamint a citokróm C ezzel párhuzamos citoplazmatikus felszabadulása a mitokondriumokból alátámasztotta, hogy a külső (extrinsic) mellett

a belső (intrinsic) kaspázjelút is aktiválódott (4. ábra). Ezzel párhuzamosan a DAMP-szignálok felülregulációja és felszabadulása is zajlott. Chaperonfehérjék, mint a korai hő- és sejtstresszasszociált Hsp70 és az endoplazmás retikulum stresszt jelző kalciumkötő kalretikulin citoplazmatikus megjelenése és dúsulása a sejtmembránrégióban, valamint a nem hiszton típusú, de a gének átírásának szabályozásában részt vevő HMGB1 protein kiszabadulása a sejtmagokból, majd a sejtekből egyre fokozódott a vizsgálati periódus (24–48–72 órával az mEHT-kezelés után) során (5. ábra). A progresszív tumorsejtpusztulást és DAMP-felszabadulást a tumort infiltráló S100-pozitív antigénprezentáló dendritikus sejtek, a CD3-pozitív T-sejtek (5. ábra), az F4/80-pozitív makrofágok, valamint a T-sejtekhez hasonlóan granzim B-pozitív természetes ölő-(NK)-sejtek kísérték.

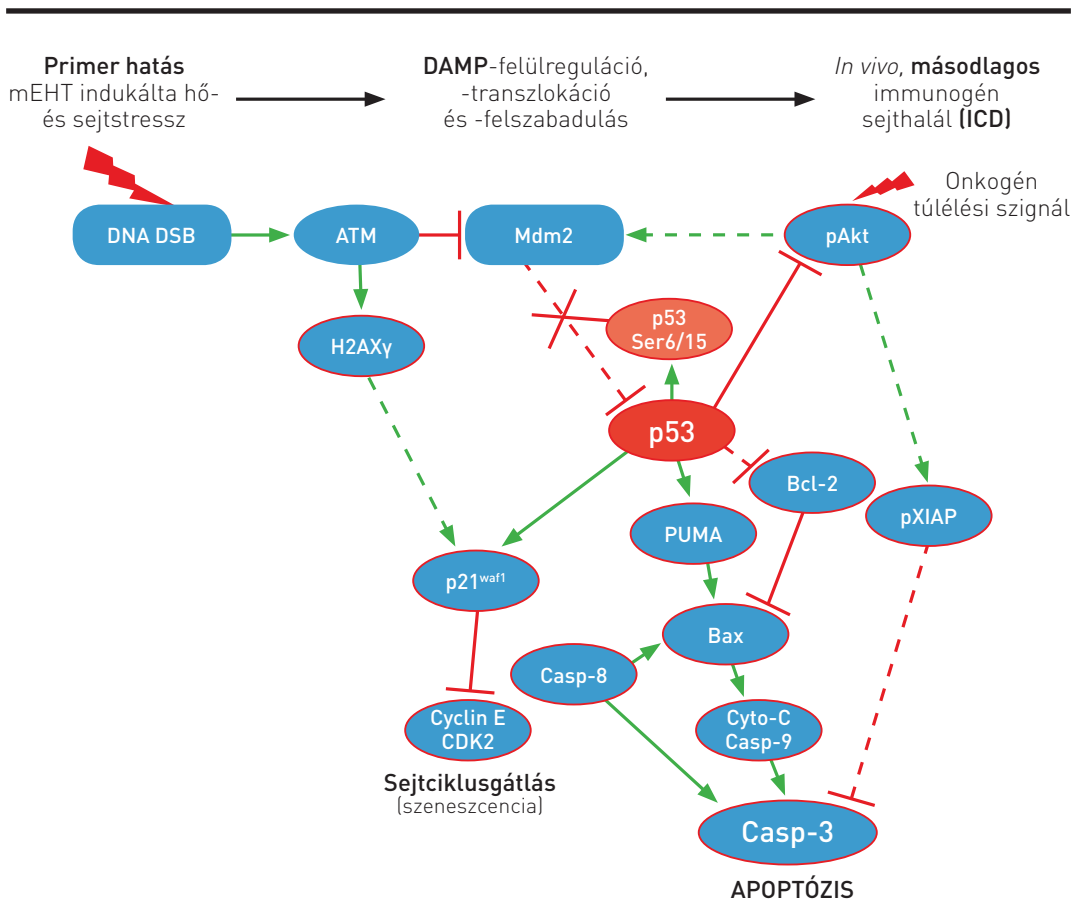
A CD3-pozitív sejtek kis hányada nukleáris FoxP3-pozitivitást mutatott, jelezve a regulátor, tumorellenes immunitást gátló T-sejtek jelenlétét is. Számos esetben az ellenoldali, nem kezelt tumorokban is láttunk tumorpusztulást, DAMP-, ill. immunsejt-akkumulációt, melyek azonban nem bizonyul-

tak szignifikánsnak. Amikor a lokoregionális mEHT-kezeléssel együtt az állatok egy immunválaszt támogató klorogénsavban gazdag (Marsdenia Tenacissima extraktum, MTE) (12, 13) ágenst is kaptak intraperitoneálisan, az ellenoldali, nem kezelt tumorokban is szignifikáns tumorpusztulás jelentkezett, a kezelt oldalhoz hasonló DAMP-akkumuláció és immunsejt-infiltráció kíséretében.

**KÖZÖLT EREDMÉNYEINKBŐL LEVONHATÓ KÖVETKEZTETÉSEK**

Eredményeink alapján az mEHT-kezelés lehetséges hatásmechanizmusát a 6. ábra foglalja össze.

A C26 kolorektális adenokarcinóma sejtenyészetben az mEHT-kezelés irreverzibilis sejtstresszt okozott, ami aktiválta mind a kaspázfüggő apoptózis, mind a ciklinfüggő kinázt gátló p21<sup>waf1</sup> által közvetített tartós sejtciklusgátlás (szeneszcencia) mechanizmusait. Az mEHT hatásában nagy valószínűséggel a p53 onkoszuppresszor fehérje felülregulációja játszott a vezető szerepet. A p53 foszforilációja (Ser15) hozzájárulhatott a fehérje Mdm2-gátlással szembeni



**6. ÁBRA.** Az mEHT indukálta tumordestrukció lehetséges hatásmechanizmusának vázlata C26 kolorektális adenokarcinóma *in vitro* és *in vivo* modelljeiben nyert eredményeink alapján

stabilizációjához, amit az onkogén foszforilált Akt fehérje szintjének csökkenése is támogatott [16]. Kombinációban az mEHT-kezelés támogatta a doxorubicin felvételét és szignifikánsan fokozta annak citotoxikus hatását [14].

Az mEHT-kezelés a C26 tumorsejtekből létrehozott *in vivo* modellben is irreverzibilis hő- és sejtszesszt indukált, ami a tumorsejtek kaszpázfüggő apoptózisához vezetett. Mind a külső, mind a belső sejthalálutak aktiválódtak, és a sejtpusztulással párhuzamosan károsodási (DAMP) szignálok is felszabadultak a tumorsejtekből. Az egyszeri mEHT-kezelést követően kialakult progresszív tumorpusztulás, valamint antigénprezentáló és T-sejtek akkumulációja, tehát a primer tumorelles hatás mellett egy másodlagos immunogén sejthalál (ICD) valószínűségét is felveti. A másodlagos hatás a távoli, nem kezelt oldalra is

kiterjeszhető (abszokopális hatás) az mEHT immunpromoter ágenssel történő kombinálásával.

A daganatsejt-pusztuláshoz vezető, mEHT indukálta molekuláris válaszok feltárása támogatja a nem invazív, elhanyagolható mellékhatásokkal járó mEHT-kezelés hatékonyabb kombinált alkalmazását kemo-, radio-, ill. molekuláris célpontú terápiával. Emellett eredményeink a humán onkológiai kezelések hatékonyságának javítását célzó további transzlációs kutatásokat indíthatnak el.

**Köszönetnyilvánítás:** A szerzők nagyon hálásak Mátrainé Balogh Évának a kísérletekhez nyújtott magas színvonalú technológiai támogatásáért.

*Kutatásainkat a Nemzeti Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatta (NVKP\_16-1-2016-0042).*

## IRODALOM

- Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 383:1490–1502, 2014
- Boland PM, Ma WW. Immunotherapy for colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 9:pii: E50, 2017
- Koido S, Ohkusa T, Homma S, et al. Immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 19:8531–8542, 2013
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62:220–241, 2012
- Lynch D, Murphy A. The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer. *Ann Transl Med* 4:305, 2016
- Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, et al. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. *Cell Stress Chaperones* 20:37–46, 2015
- Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, et al. DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia. *Strahlenther Onkol* 190:815–822, 2014
- Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell Death Differ* 21:26–38, 2014
- Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 31:51–72, 2013
- Repasky EA, Evans SS, Dewhirst MW. Temperature matters! And why it should matter to tumor immunologists. *Cancer Immunol Res* 1:210–216, 2013
- Szasz A, Szasz N, Szasz O. *Oncothermia: Principles and Practices*. Springer Netherlands, 2010, pp. 36–38
- Li W, Yang Y, Ouyang Z, et al. Xiao-Ai-Ping, a TCM injection, enhances the antigrowth effects of cisplatin on Lewis lung cancer cells through promoting the infiltration and function of CD8(+) T lymphocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:879512, 2013
- Kang TY, Yang HR, Zhang J, et al. The studies of chlorogenic acid antitumor mechanism by gene chip detection: the immune pathway gene expression. *J Anal Methods Chem* 2013:617243, 2013
- Vancsik T, Forika G, Balogh A, et al. Modulated electro-hyperthermia induced p53 driven apoptosis and cell cycle arrest additively support doxorubicin chemotherapy of colorectal cancer in vitro. *Cancer Med* 8:4292–4303, 2019
- Vancsik T, Kovago C, Kiss E, et al. Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. *J Cancer* 9:41–53, 2018
- Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, et al. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21:1299–1303, 2002

## MAGYAR ONKOLÓGIA

**Főszerkesztő:** Dr. Tímár József, mobil: (06-20) 825-9685, e-mail: jtimar@gmail.com | **Kéziratok küldése:** jtimar@gmail.com, nagy.judit@pphmedia.hu  
**Index:** 25551. **ISSN** 0025-0244 | **Előfizethető a kiadónál:** Professional Publishing Hungary Kft. (1037 Budapest, Montevideo u. 3/B) | **Éves előfizetési díj:** 13 440 Ft+áfa, MOT-tagoknak ingyenes. Bazsonyi Réka, elfozetes@pphmedia.hu, Telefon: (361) 430-4503 | **Kiadja:** Professional Publishing Hungary Kft. (1037 Budapest, Montevideo u. 3/B) évi négy füzetben | **Felelős kiadó:** Vándor Ágnes, a Professional Publishing Hungary Kft. ügyvezetője. | Terjeszti a Magyar Posta Zrt., Hírlap Igazgatóság, Hírlap Értékesítési Osztály, 1089 Budapest, Orczy tér 1. és a Professional Publishing Hungary Kft. | © Professional Publishing Hungary Kft. 2019. | **Lapterv:** Szabó Zsuzsanna | **Nyomdai elő-** **PPH MĒDIA**  
**készítés:** Professional Publishing Hungary Kft. | **Nyomdai előállítás:** EPC Nyomda a Südwestdeutsche Medienholding tagja