

IMMUNOFENOTYP KOMÓREK W PRAWIDŁOWEJ HEMATOPOEZIE

CELLS IMMUNOPHENOTYPE IN NORMAL HEMATOPOIESIS

Grzegorz ŻYDOWICZ, Bogdan MAZUR

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie: Ocena immunofenotypu komórek jest jedną z ważnych metod umożliwiających postawienie właściwej diagnozy, a także wybór odpowiedniego schematu postępowania w wielu schorzeniach hematologicznych. Poznanie prawidłowego obrazu hematopoezy jest niezwykle ważne, ponieważ pozwala na określenie odstępstw od normy przy ocenie materiału patologicznego. W pracy przedstawiono schemat zmian ekspresji antygenów na/w komórkach w trakcie procesu krwiotworzenia. Zaproponowano również schematy trzy-, cztero- i sześciokolorowej cytometrycznej analizy ekspresji antygenów komórek biorących udział w normalnej hematopoezie.

Summary: Immunophenotyping is a significant method for hematocology diseases diagnosis and treatment. The knowledge about normal hematopoiesis enables the estimation of aberrant antigens patterns in pathological specimen. In this paper the authors are presenting immunophenotypic differentiation patterns in normal hematopoiesis. A three-, four-, and six color flow cytometry analysis scheme of antigens expression have also been proposed.

Wykaz skrótów: **APC** – allofikoecjanina – fluorochrom; **APC-Cy7** – tandem fluorochromów – allofikoecjaniny i cyjaniny 7; **CD** (*cluster of differentiation*) – antygeny różnicowania – nazwy (z numerami) antygenów komórek ludzkich przyjęte na kolejnych międzynarodowych warsztatach; **cy** (w złożeniach, od *cytoplasmatic*) – oznaczano zawartość antygeny w cytoplazmie, wewnątrzkomórkowo; **FITC** – izotiocyanian fluoresceiny – fluorochrom; **FS** (*forward scatter*) – pomiar ugięcia wiązki lasera na brzegu komórki – wielkość sygnału zależna od wielkości komórki, **HLA-DR** (*Human Leucocytes Antigens*) – antygeny „zgodności tkankowej” podzielone na klasy, antygeny DP, DQ, DR należą do klasy II; **MPO** – mielo-peroksydaza; **PE-Cy5** – tandem fluorochromów – fikoerytryny i cyjaniny 5; **PE-Cy7** – tandem fluorochromów – fikoerytryny i cyjaniny 7; **PerCP** (*Peridinin-chloro-phyll-protein*) – fluorochrom; **RPE (PE)** – fikoerytryna – fluorochrom; **s** (w złożeniach od *surface*) – oznaczano obecność antygeny na powierzchni komórki; **SS** (*side scatter*) – pomiar rozproszenia wiązki lasera na strukturach komórki; **TcR** – receptory limfocytów T (odpowiednio: $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$); **TdT** – Terminalna Transferaza Deoksynukleotydowa; κ, λ – łańcuchy lekkie immunoglobulin (odpowiednio kappa i lambda); μ – łańcuch ciężki immunoglobuliny M.

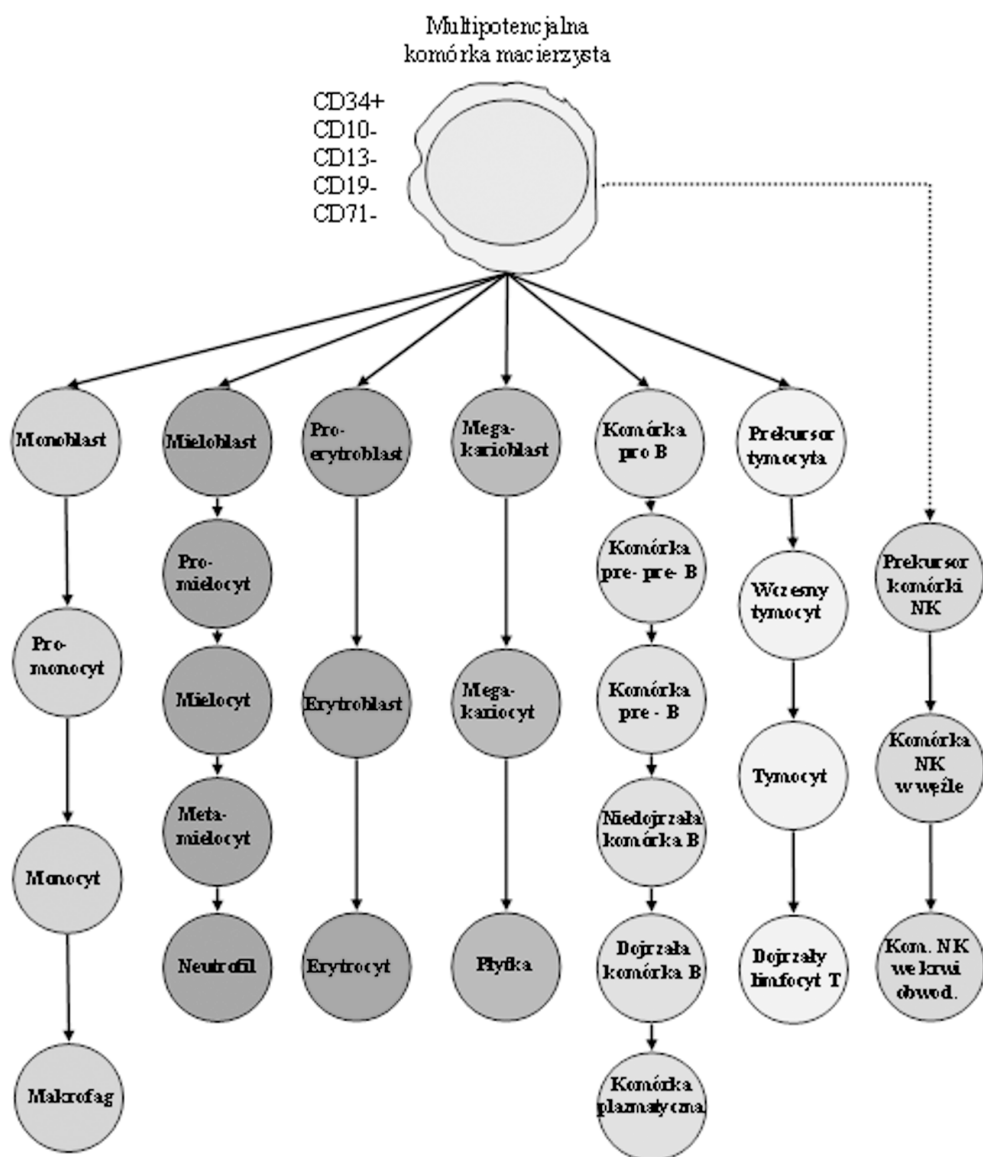
WSTĘP

Proces hematopoezy odbywa się w czasie całego życia człowieka. Już w kilka tygodni od zapłodnienia pojawiają się wianuszkowato ułożone wysepki krwiotworzenia, w których centralne miejsce zajmują pierwotne erytroblasty. Od 6 do 8 tygodnia życia płodowego siedliskiem komórek krwiotwórczych staje się wątroba. Okres wątrobowy trwa zazwyczaj aż do porodu. Od 4 miesiąca życia płodowego szpik kostny przejmuje powoli funkcje producenta elementów morfotycznych krwi. W okresie okołoporodowym szpik jest już w zasadzie wyłącznym źródłem komórek macierzystych wszystkich krwinek i głównym źródłem prekursorów limfocytów. Stan ten utrzymuje się, a proces hematopoezy poza szpikiem dotyczy również innych narządów: grasicy, śledziony, węzłów limfatycznych [29, 32, 37].

Czas życia komórek krwi wynosi od jednego dnia (granulocyty) do kilku lat (komórki pamięci), konieczne więc jest stałe dostarczanie nowych krwinek do obiegu. W związku z ciągłym zapotrzebowaniem w szpiku występują komórki różnych linii w różnych stadiach dojrzewania. Obecność tych komórek wykazywano przy pomocy różnicowania morfologicznego [26], jednak dotyczyło to już komórek ukierunkowanych. Najlepiej różnicowanie komórek krwi od najmniej dojrzałych można zobrazować przy pomocy oceny ekspresji antygenów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych. Najwygodniejszym narzędziem do oceny ekspresji antygenów na/w komórkach jest cytometr przepływowy pozwalający również na określenie różnicujących cech fizycznych komórek (wielkość, obecność struktur wewnątrzkomórkowych) [2, 15, 16, 25, 38]. Poznanie prawidłowego obrazu hematopoezy jest niezwykle ważne, ponieważ pozwala na określenie odstępstw od normy przy ocenie materiału patologicznego. Należy z dużym naciskiem podkreślić, że dla uzyskania w pełni wiarygodnego wyniku (szczególnie jeśli ma on być podstawą diagnozy i leczenia) badanie cytometryczne nie może obyć się bez analizy rozmazu komórkowego.

KOMÓRKI MACIERZYTE

Funkcjonalnie komórki macierzyste są identyfikowane jako komórki multipotencjalne, zdolne do samoodtwarzania oraz ukierunkowanego zapotrzebowaniem różnicowania się we wszystkie linie komórek krwi (zresztą nie tylko krwi). Obie te cechy są unikalne dla tych pierwotnych komórek, tym nie mniej nie pozwalają na wyodrębnienie ich spośród innych. Również morfologicznie komórki macierzyste nie są odróżnialne od limfocytów. Jedyną metodą wyróżnienia komórek macierzystych jest określenie ich struktury antygenowej. Ze względu na niewielki odsetek tych komórek (zazwyczaj poniżej 1% mononuklearów krwi obwodowej i 5% w szpiku) metodą pozwalającą wydajnie ocenić te komórki jest cytometria przepływowa. Antygenem charakterystycznym dla tej grupy jest antygen CD34. Dodatkowym kryterium jest brak ekspresji antygenów właściwych dla komórek ukierunkowanych: CD7, CD10, CD13, CD19, CD33, CD71 (związek tych antygenów z odpowiednimi liniami komórek jest przedstawiony poniżej) [10, 14].



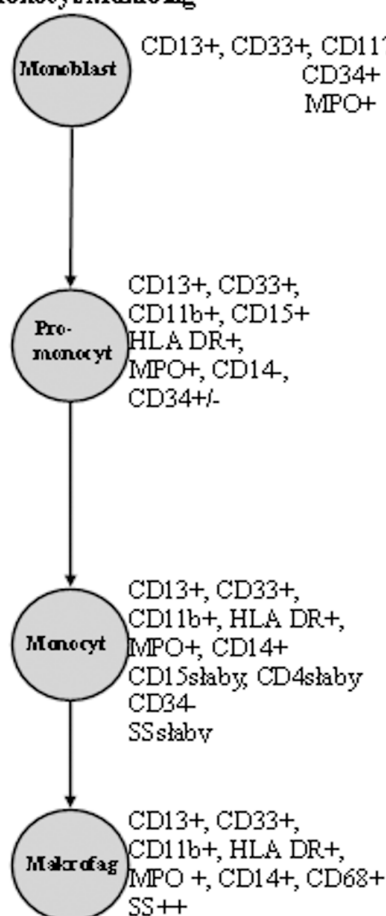
RYCINA 1. Schemat prawidłowej hematopoezy

LINIE KOMÓREK

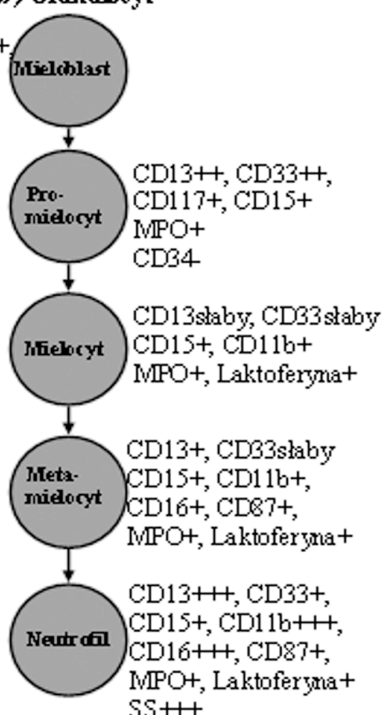
Linia mieloidalna

Komórki linii mieloidanej (ryc. 2) charakteryzują się pojawianiem się antygenów CD13, CD33, CD117 oraz HLA-DR. We wczesnym stadium ukierunkowania, komórki te zachowują jeszcze antygen CD34. Na tym etapie nie można immunologicznie odróżnić

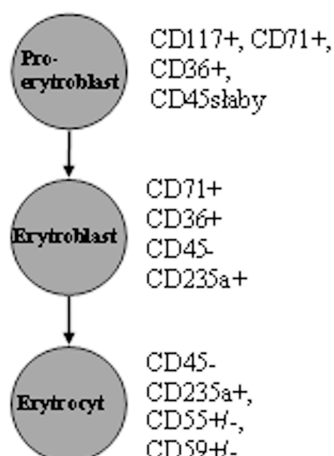
a) Monocyt/Makrofag



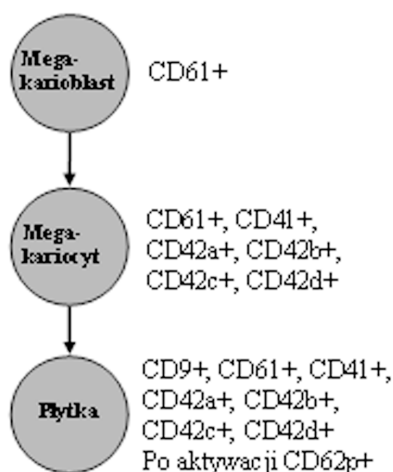
b) Granulocyt



RYCINA 2. Rozwój komórek linii mieloidalej



RYCINA 3. Erytropoeza



RYCINA 4. Dojrzewanie płytek

mieloblastów (prekursorowe komórki granulocytarne) [1, 5, 8, 33] od monoblastów (prekursorowe komórki monocytarne). Ważnym parametrem różnicującym w badaniu cytometrycznym jest wartość SS (*side scatter*, rozproszenie światła pod kątem 90°). Monocyty i ich prekursorzy mają niższy SS od granulocytów i ich prekursorów [18, 34, 36].

Linia erytroidalna

Komórki linii erytroidalnej (ryc. 3) charakteryzują się wraz z rozwojem stopniową zmianą wielkości oraz utratą jądra. Proerytroblasty wywodzące się z komórek macierzystych, podobnie jak komórki linii mieloidalnej wykazują wczesną ekspresję antygenu CD117, następnie CD36. Słaba ekspresja CD45 zanika wraz z utratą jądra. Najbardziej charakterystycznymi antygenami są CD71 (receptor transferyny) i CD235a (Glikoforyna A) [3, 9, 18, 19].

Linia megakariocytarna

Linia megakariocytarna (ryc. 4) różnicuje się z komórek CD34+, CDw123+ pod wpływem czynników wzrostowych, komórki dojrzewając nabywają glikoprotein powierzchniowych CD61, CD41 [3, 18, 23, 24, 37].

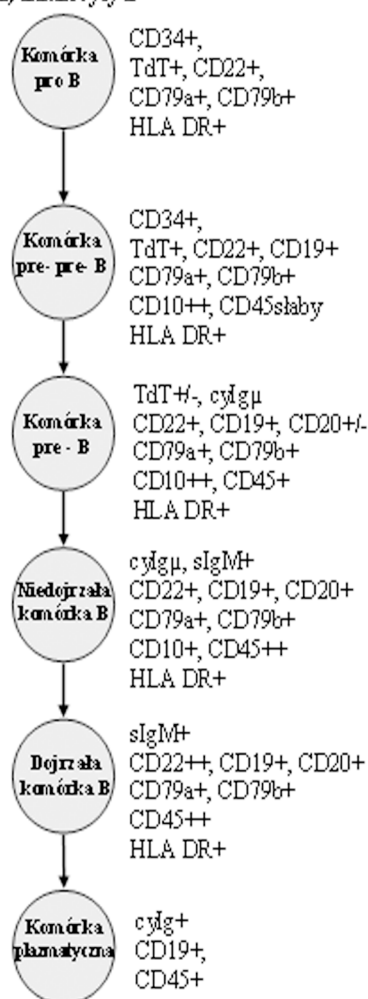
Linia limfoidalna

Komórki linii limfoidalnej (ryc. 5) stanowią najwcześniej wyróżniającą się z komórek macierzystych i najbardziej różnorodną antygenowo grupę. Dojrzewanie limfocytów B i ich prekursorów zachodzi w szpiku [4, 11, 27, 30, 31], natomiast poza wczesnym etapem szpikowym, dojrzewanie limfocytów T odbywa się w grasicy [12, 13, 35], a komórek NK (najprawdopodobniej) w węzłach chłonnych [6, 7]. Początkowo wszystkie komórki linii limfoidalnej charakteryzują się obecnością antygenu CD34 oraz wewnątrzkomórkowego TdT, dopiero później pod wpływem różnych cytokin komórki różnicują się i przechodzą swoiste fazy dojrzewania [18, 20, 21, 22].

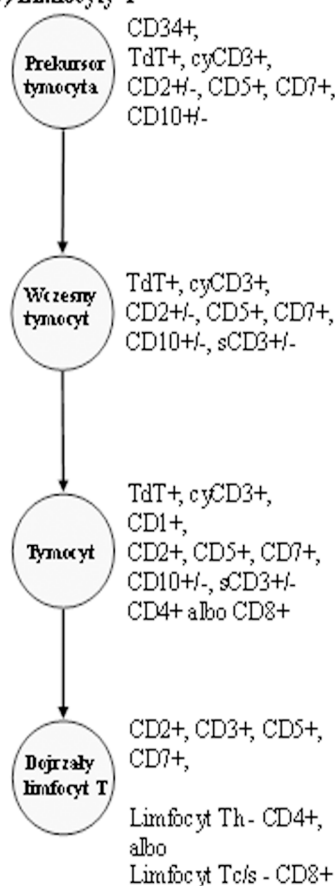
PROPOZYCJA KOMBINACJI PRZECIWCIAŁ DO OZNACZANIA KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH

Na zakończenie pozwalamy sobie przedstawić w tabelach 1a, b i c propozycje różnych kombinacji przeciwciał sprzęgniętych z fluorochromami, przydatne w oznaczaniu prawidłowej hematopoezy i patologii. W zależności od posiadanego sprzętu można użyć zestawów trzy, cztero- lub sześciokolorowych. Oczywiście wprawny diagnosta poradzi sobie również używając zestawów dwukolorowych, jednak występuje wyraźna tendencja do zwiększania liczby barwników, ponieważ większa to niesłychanie informacje uzyskane o komórkach, a tym samym prawidłową diagnozę [17, 18, 28].

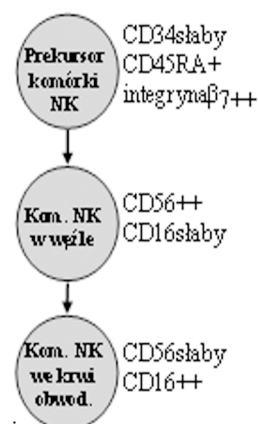
a) Limfocyty B



b) Limfocyty T



c) Komórki NK



RYCINA 5. Rozwój komórek linii limfoidalnej

TABELA 1a. Trzykolorowa kombinacja przeciwciał [28]

Proponowane fluorochromy			Informacja uzyskana w trakcie badania
FITC	R-PE	PerCP albo R-PE-Cy5	
HLA-DR	CD14	CD45	Bramka kontrolna, komórki niedojrzałe
CD8	CD4	CD3	Subpopulacje dojrzałych limfocytów T
TcR γ/δ	TcR α/β	CD2	Subpopulacje limfocytów T
CD10	CD5	CD19	Komórki B (dojrzałe i niedojrzałe)
CDw65	CD33	CD64	Dojrzewanie komórek mieloidalnych
CD7	CD56	CD13	Niedojrzałe komórki mieloidalne, limfocyty T
CD61	CD117	CD34	Różnicowanie megakariocytów, niedojrzałe komórki mieloidalne
CD235a	CD1a	CD45	Erytroblasty, niedojrzałe limfocyty T
s κ	s λ	CD19	Klonalność dojrzałych limfocytów B
sIgM	CD15	CD22	Dojrzewanie limfocytów B i komórek mieloidalnych
TdT	cyCD22	cyCD3	Niedojrzałe limfocyty B i T
MPO	Laktoferyna	CD34	Wczesne komórki mieloidalne

TABELA 1b. Czterokolorowa kombinacja przeciwciał (wg [18])

Proponowane fluorochromy				Informacja uzyskana w trakcie badania
FITC	PE	PerCP	APC	
TdT	CD20	CD19	CD10	Dojrzewanie i różnicowanie limfocytów B
CD45	CD34	CD19	CD22	
cyIg μ	sIgM	CD20	CD10	
s κ	s λ	CD20	CD10	
CD34	CD117	CD45	CD13.33	Różnicowanie i dojrzewanie monocytów/granulocytów
CD14	CD33	CD45	CD34	Różnicowanie i dojrzewanie monocytów
CD36	CD64 albo CD4	CD14	CD34 albo CD68	
CD16	CD13	CD45	CD11b	Różnicowanie i dojrzewanie granulocytów
CD71	CD235a	CD45	CD117	Dojrzewanie erytroblastów
CD2	CD5	CD3	CD7	Dojrzewanie i różnicowanie limfocytów T
CD4	CD8	CD3	HLA-DR	

TABELA 1c. Sześciokolorowa kombinacja przeciwciał

Proponowane fluorochromy						Informacja uzyskana w trakcie badania
FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	
CD3	CD16.56	CD45	CD19	—	—	Analiza ilościowa limfocytów T, limfocytów B, komórek NK
CD15	CD13	CD45	CD16	CD11b	CD14	Rozkład leukocytów
CD2	CD56	CD3	CD7	CD5	CD8	Analiza populacji limfocytów T
CD27	CD45RA	CD3	CD4	CD45RO	CD8	Limfocyty T: dziewicze/pamięci
CD28	CD197	CD3	CD8	CD45RO	CD27	Limfocyty T: dziewicze/pamięci
TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	CD3	CD4	CD25	CD8	Limfocyt T: $\alpha\beta/\gamma\delta$, Limfocyty T reg
CD94	CD16	CD3	CD56	CD8	CD2	Komórki NK
CD57	Perforyna	CD3	CD16	HLA-DR	CD8	Limfocyty T: cytotoksyczne/aktywowane
CD57	CD38	CD3	CD69	HLA-DR	CD8	Limfocyty T aktywacja
V 24	V 11	CD3	CD56	CD4	CD8	Komórki NK, Limfocyty T
SmIg κ	SmIg λ	CD19	CD21	CD22	CD81	Limfocyty B
CD5	CD38	CD19	CD21	CD10	CD20	Różnicowanie limfocytów B:
SmIgD	CD23	CD19	CD21	SmIgM	CD27	Limfocyty B strefy brzeżnej /pamięci
SmIgA	SmIgG	CD19	CD40	SmIgM	CD27	Limfocyty B przełączenie klas Ig

Wraz z rozwojem techniki laserowej (pojawiają się coraz tańsze i trwalsze lasery diodowe/fazy stałej) oraz udoskonalaniem oprogramowania, cytometria przepływowa staje się coraz wygodniejszym i prostszym narzędziem do oznaczania i analizy populacji i subpopulacji komórek hematopoetycznych.

LITERATURA

- [1] ANDERSON KL, SMITH KA, PERKIN H, HERMANSON G, ANDERSON CG, JOLLY DJ, MAKI RA, TORBETT BE. PU.1 and the Granulocyte- and Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptors Play Distinct Roles in Late-Stage Myeloid Cell Differentiation. *Blood* 1999; **94**: 2310–2318.
- [2] ANDREONI C, RIGAL D, BONNARD M, BERNAUD J. Phenotypic analysis of a large number of normal human bone marrow sample by flow cytometry. *Blut* 1990; **61**(5): 271–277.
- [3] DEBILIN, COULOMBEL L, CROISILLE L, KATZ A, GUICHARD J, BRETON-GORIUS J, VAINCHENKER W. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* 1996; **88**: 1284–1296.
- [4] DUPERRAY C, BOIRON JM, BOUCHEIX C, CANTALOUPE JF, LAVABRE-BERTRAND T, ATTAL M, BROCHIER J, MARANINCHI D, BATAILLE R, KLEIN B. The CD24 antigen discriminates between pre-B and B cells in human bone marrow. *J Immunol* 1990; **145**: 3678–3683.
- [5] ELGHETANY MT, PATEL J, MARTINEZI, SCHWAB H. CD87 as a Marker for Terminal Granulocytic Maturation: Assessment of Its Expression During Granulopoiesis. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; **51B**: 9–13.

- [6] FARAG SS, CALIGIURI MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; **20** (3): 123–137.
- [7] FREUD AG, BECKNELL B, ROYCHOWDHURY S, MAO HC, FERKETICH AK, NUOVO GJ, HUGHES TL, MARBURGER TB, SUNG J, BAIOCCHI RA, GUIMOND M, CALIGIURI MA. A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56bright Natural Killer Cells. *Immunity* 2005; **22**: 295–304.
- [8] FUJIMOTO H, SAKATA T, HAMAGUCHI Y, SHIGA S, TOHYAMA K, ICHIYAMA S, WANG F, HOUWEN B. Flow Cytometric Method for Enumeration and Classification of Reactive Immature Granulocyte Populations. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 2000; **42**: 371–378.
- [9] GARRATTY G, ARNDT PA. Applications of Flow Cytofluorometry to Red Blood Cell Immunology. *Cytometry B Clin Cytom* 1999; **38**: 259–267.
- [10] DI GIUSTO D, CHEN S, COMBS J, WEBB S, NAMIKAWA R, TSUKAMOTO A, CHEN BP, GALY AH. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood* 1994; **84**: 421–432.
- [11] GRUMAYER ER, GRIESINGER F, HUMMELL DS, BRUNNING RD, KERSEY JH. Identification of novel B-lineage cells in human fetal bone marrow that coexpress CD7. *Blood* 1991; **77**: 64–68.
- [12] GUIDOS C. Thymus and T-lymphocyte development: what is new in the 21st century? *Immunol Rev* 2006; **209**: 5–9.
- [13] HAN X, BUESO-RAMOS CE. Precursor T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma and Acute Biphenotypic Leukemias. *Am J Clin Pathol* 2007; **127**: 528–544.
- [14] HOFMANN SR, ETTINGER R, ZHOU YJ, GADINA M, LIPSKY P, SIEGEL R, CANDOTTI F, O'SHEA JJ. Cytokines and Their Role in Lymphoid Development, Differentiation and Homeostasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; **2**(6): 495–506.
- [15] KNAPP W, STROBL H, MAJDIC O. Flow Cytometric Analysis of Cell-Surface and Intracellular Antigens in Leukemia Diagnosis. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1994; **18**: 187–198.
- [16] KUSSICK SJ, FROMM JR, ROSSINI A, LI Y, CHANG A, NORWOOD TH, WOOD BL. Four-Color Flow Cytometry Shows Strong Concordance With Bone Marrow Morphology and Cytogenetics in the Evaluation for Myelodysplasia. *Am J Clin Pathol* 2005; **124**(2): 170–181.
- [17] LAMBERT C, CRISTINA I, CHRISTIAN G. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of a new flow cytometer. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; **70**(1): 29–38.
- [18] VAN LOCHEM EG, VAN DER VELDEN VHJ, WIND HK, TE MARVELDE JG, WESTERDAAL NAC, VAN DONGEN JJM. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; **60B**: 1–13.
- [19] LOKEN MR, SHAH VO, DATTILIO KL, CIVIN CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood* 1987; **69**: 255–263.
- [20] LOKEN MR, SHAH VO, DATTILIO KL, CIVIN CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; **70**: 1316–1324.
- [21] LOKEN MR, SHAH VO, HOLLANDER Z, CIVIN CI. Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development. *Pathol Immunopathol Res* 1988; **7**: 357–370.
- [22] MAINO VC, PICKER LJ. Identification of Functional Subsets by Flow Cytometry: Intracellular Detection of Cytokine Expression. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1998; **34**: 207–215.
- [23] MURPHY GJ, LEAVITT AD. A model for studying megakaryocyte development and biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 3065–3070.
- [24] PANG L, WEISS MJ, PONCZ M. Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3332–3338.
- [25] PATTANAPANYASAT K, KYLE DE, TONGTAWA P, YONGVANITCHIT K, FUCHAROEN S. Flow Cytometric Immunophenotyping of Lymphocyte Subsets in Samples That Contain a High Proportion of Non-Lymphoid Cells. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1994; **18**: 199–208.
- [26] PEASE DC. An Electron Microscopic Study of Red Bone Marrow. *Blood* 1956; **11** (6): 501–526.
- [27] PONTVERT-DELUCQ S, BRETON-GORIUS J, SCHMITT C, BAILLOU C, GUICHARD J, NAJMAN A, LEMOINE FM. Characterization and Functional Analysis of Adult Human Bone Marrow Cell Subsets in Relation to B-Lymphoid Development. *Blood* 1993; **82** (2): 417–429.
- [28] ROTHE G, SCHMITZ G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996; **10**(5): 877–895.

- [29] ROY V, MILLER JS, VERFAILLIE CM. Phenotypic and functional characterization of committed and primitive myeloid and lymphoid hematopoietic precursors in human fetal liver. *Exp Hematol* 1997; **25**(5): 387–394.
- [30] RYAN DH, NUCCIE BL, RITTERMAN I, LIESVELD JL, ABOUD CN, INSEL RA. Expression of Interleukin-7 Receptor by Lineage-Negative Human Bone Marrow Progenitors With Enhanced Lymphoid Proliferative Potential and B-Lineage Differentiation Capacity. *Blood* 1997; **89**: 929–940.
- [31] SCHMITT C, EAVES CJ, LANSDORP PM. Expression of CD34 on human B cell precursors. *Clin Exp Immunol* 1991; **85**(1): 168–173.
- [32] SMITH C. Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis. *Cancer Control* 2003; **10**(1): 9–16.
- [33] TENEN DG, HROMAS R, LICHT JD, ZHANG DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 1997; **90**(2): 489–519.
- [34] TERSTAPPEN LW, SAFFORD M, LOKEN MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia* 1990; **4**: 657–663.
- [35] WU L. T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**(2): 121–126.
- [36] XU Y, MCKENNA RW, KARANDIKAR NJ, PILDAIN AJ, KROFT SH. Flow Cytometric Analysis of Monocytes as a Tool for Distinguishing Chronic Myelomonocytic Leukemia From Reactive Monocytosis. *Am J Clin Pathol* 2005; **124**(5): 799–806.
- [37] ZAULI G, VALVASSORI L, CAPITANI S. Presence and characteristics of circulating megakaryocyte progenitor cells in human fetal blood. *Blood* 1993; **81**: 385–390.
- [38] ZOLA H, SWART B, NICHOLSON I, AASTED B, BENSUSSAN A, BOUMSELL L, BUCKLEY C, CLARK G, DRBAL K, ENGEL P, HART D, HOREJSI V, ISACKE C, MACARDLE P, MALAVASI F, MASON D, OLIVE D, SAALMUELLER A, SCHLOSSMAN SF, SCHWARTZ-ALBIEZ R, SIMMONS P, TEDDER TF, UGUCCIONI M, WARREN H. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 2005; **106**(9): 3123–3126.

Bogdan Mazur

Śląski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii

ul. 3-ego Maja 13/15, 41-800 Zabrze

e-mail: bmazur@slam.katowice.pl