

Sposób amplifikacji DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy za pomocą starterów specyficznych dla genu ITGAM.

Przedmiotem wynalazku jest sposób amplifikacji DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy za pomocą starterów specyficznych dla genu ITGAM.

Wynalazek rozwiązuje problem amplifikacji DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy z jednoczesnym oznaczaniem 3 wybranych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphisms – SNPs): rs7193943 (c.-323G>A), rs8058867 (c.-1347A>C) oraz rs8057320 (C.-1835C>T) zlokalizowanych w pobliżu genu ITGAM (sekwencja regulatorowa genu) za pomocą dwóch kolejno wykorzystywanych zestawów nowych specyficznych starterów reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. polymerase chain reaction – PCR), gdzie zestaw 1 zawiera startery (określone na potrzeby niniejszego zgłoszenia patentowego jako: F1, R1, F2, R2, F3, R3) pozwalające na jednoczesną amplifikację (powielenie) 3 wybranych sekwencji DNA (określonych na potrzeby niniejszego zgłoszenia patentowego jako: PCR1, PCR2, PCR3) osoby badanej w reakcji multipleks PCR a zestaw 2 zawiera startery (określone na potrzeby niniejszego zgłoszenia patentowego jako: SN1, SN2, SN3), pozwalające na amplifikację 3 wybranych sekwencji DNA (określonych na potrzeby niniejszego zgłoszenia patentowego jako: SNP1, SNP2, SNP3) w uzyskanych uprzednio matrycach – produktach PCR (dla starterów SN1, SN2 i SN3 matryce reakcji to odpowiednio: PCR1, PCR2 i PCR3) w reakcji minisekwencjonowania.

Sekwencja nukleotydowa oznacza następujące po sobie kolejno (w orientacji 5` → 3`) zasady azotowe (puryny i pirymidyny) gdzie A oznacza adeninę, T tyminę, G guaninę, C cytozynę.

Gen ITGAM (ang. integrin subunit alpha M) znany również jako cząsteczka różnicująca 11B (CD11B), antygen makrofagowy 1 (ang. macrophage-1 antigen, Mac-1) lub jako receptor układu dopełniacza 3 (ang. complement receptor 3, CR3 lub complement receptor 3A, CR3A) jest zlokalizowany na chromosomie 16p11.2. Gen ten koduje białko będące podjednostką heterodimerycznej integryny alfa-M-beta-2. Jako integryna podlega ekspresji na wielu leukocytach [monocytach, makrofagach, komórkach dendrytycznych (ang. dendritic cells, DCs), granulocytach oraz komórkach NK] i jest zaangażowany w rozwój stanu

zapalnego w ramach wrodzonej odpowiedzi immunologicznej.[1] Produkt genu ITGAM odpowiada za działanie receptorów dla INF- γ oraz regulację wydzielania mediatorów stanu zapalnego. Zaobserwowano, że w przypadku niskiej ekspresji ITGAM na powierzchni komórek prezentujących antygen (APCs) dochodzi do wzmożonej produkcji interleukin (IL), m.in.: IL-6 oraz IL-17.[1-2] Wykazano wpływ SNP (rs1143679) na poziom zarówno transkryptu, jak i białka ITGAM na powierzchni monocytów u pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym (ang. systemic lupus erythematosus, SLE). Poziom mRNA zależał od genotypu (a ilość białka była proporcjonalna do poziomu transkryptu). Ponad 2-krotny spadek poziomu białka występował u chorych z genotypem AA (predysponującym do większego ryzyka) w stosunku do chorych z genotypem GG (z grupy mniejszego ryzyka). Różnice w ekspresji tego białka wynikać mogą ze specyficznego dla alleli z grupy ryzyka spadku represji transkrypcji.[3] Produkt genu ITGAM wydaje się mieć kluczowe znaczenie w patomechanizmie chorób o podłożu autoimmunologicznym, najczęściej SLE.[1-3]. Jednak ze względu na potwierdzony związek pomiędzy obserwowanymi zmianami w genie ITGAM a rozwojem stanu zapalnego nie można wykluczać potencjalnego znaczenia statusu tego genu również w innych jednostkach chorobowych w przebiegu których tego typu procesy są obserwowane. Przykładem są zaburzenia stanu odżywienia, które występują u większości pacjentów onkologicznych. Najpoważniejszym zaburzeniem stanu odżywienia jest kacheksja nowotworowa, która w przypadku nowotworów głowy i szyi (ang. head and neck cancer, HNC) wykrywana jest u 44-88% chorych poddawanych leczeniu radioterapią (ang. radiotherapy, RT), chemioterapią lub chemioradioterapią.[4] Zaburzenia te są ponadto często spotykane u chorych z nowotworami układu oddechowego lub przewodu pokarmowego. Poza chorobami nowotworowymi kacheksja może rozwinąć się w przebiegu wielu innych chorób przewlekłych, w których często obserwuje się długotrwały stan zapalny (m.in. kacheksję diagnozuje się ją u 8-42% chorych na przewlekłą niewydolność serca).[5-7] Sugeruje się, że głównym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi kacheksji jest toczący się proces zapalny związany z nasiloną produkcją cytokin prozapalnych m.in. IL-1, IL-6 i TNF- α (regulowaną m.in. za pośrednictwem produktu genu ITGAM).[8-10] Określenie użytecznych markerów stanu zapalnego uczestniczących w rozwoju chorób o podłożu

autoimmunizacyjnym lub zaburzeń stanu odżywienia i składu ciała, takich jak niedożywienie i kacheksja oraz wyjaśnianie mechanizmów ich działania pozwala na sprawniejsze diagnozowanie, szybsze wdrożenie leczenia, jak również opracowanie nowych, skuteczniejszych terapii.

Dostępne prace naukowe na temat znaczenia statusu genu ITGAM w różnych jednostkach chorobowych a przede wszystkim badania własne, w tym już opublikowane przez autorów niniejszego zgłoszenia patentowego, wskazują na 3 SNPs genu ITGAM: rs7193943 (c.-323G>A), rs8058867 (c.-1347A>C) oraz rs8057320 (C.-1835C>T) jako potencjalnie użyteczne w diagnozowaniu, różnicowaniu, przewidywaniu efektów terapeutycznych (skuteczności leczenia, działań niepożądanych i powikłań) i prognozowaniu w chorobach przewlekłych, którym towarzyszyć może przewlekły stan zapalny (m.in. choroby autoimmunizacyjne, choroby układu krążenia, nowotwory). [11,12]

Sobieszek i wsp. (wśród których znajdują się współautorzy niniejszego zgłoszenia patentowego) wykazali istotnie wyższe ryzyko kacheksji u chorych z przewlekłą niewydolnością serca będących nosicielami genotypu AA (rs7193943) genu ITGAM.[11] Z kolei w pracy Mazurek i wsp. (wśród których także znajdują się współautorzy niniejszego zgłoszenia patentowego) wykazano znamienne niższe ryzyko występowania zaburzeń stanu odżywienia (ewaluowanego za pomocą subiektywnej globalnej oceny stanu odżywienia – skala SGA) u chorych z HNC będących nosicielami allelu A (rs7193943).[12] Han i wsp. powiązali natomiast nosicielstwo allelu A (rs7193943) ze znamienne wyższym ryzykiem rozwoju SLE w populacjach europejskich i afrykańskich ale nie azjatyckich. W tej samej pracy oceniali oni również związek rs8057320 z ryzykiem rozwoju SLE jednak w tym przypadku okazał się on nieistotny.[13]. Ponadto, nieopublikowane dotychczas wyniki badań własnych autorów niniejszego zgłoszenia patentowego sugerują również potencjalne znaczenie SNPs rs8058867 oraz rs8057320 jako biomarkerów zaburzeń stanu odżywienia u chorych na nowotwory.

PCR jest powszechnie znaną, podstawową techniką badawczą i diagnostyczną w biologii molekularnej i medycynie. Umożliwia ona amplifikację wybranego fragmentu DNA, zazwyczaj w celu otrzymania żądanej liczby kopii matrycy. Będące modyfikacją techniki PCR minisekwencjonowanie jest również powszechnie znanym sposobem oceny SNPs. Jest to technika szczególnie

przydatna w tworzeniu profili genowych złożonych z kilku-kilkunastu różnych SNPs. Dzięki technice PCR i jej modyfikacjom dysponowanie niewielkimi ilościami DNA nie stanowi obecnie bariery w badaniach w dziedzinie biologii molekularnej oraz w procedurach diagnostycznych opartych na analizie DNA. Znane są również sposoby amplifikacji DNA w PCR za pomocą starterów specyficznych dla genu ITGAM (startery te posiadają jednak inne sekwencje nukleotydowe niż te będące przedmiotem niniejszego zgłoszenia patentowego lub nie są powszechnie udostępniane jako składniki komercyjnie dostępnych sond molekularnych).

Sposób amplifikacji (powielania) wybranych sekwencji DNA zlokalizowanych w pobliżu genu ITGAM charakteryzuje się tym, że stosuje się dwa unikalne zestawy starterów specyficznych dla 6 wybranych fragmentów DNA zlokalizowanych w sekwencji regulatorowej genu ITGAM (PCR1, PCR2, PCR3, SNP1, SNP2, SNP3), a ponadto proces prowadzi się w dwóch etapach gdzie w pierwszym etapie, stosuje się zestaw starterów specyficznych dla 3 wybranych wyżej wymienionych fragmentów DNA (PCR1, PCR2, PCR3), posiadających następujące sekwencje nukleotydowe (I zestaw starterów):

:

1a. Starter sensowny F1 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - PCR1:

„5` TTACAGGCATGAGCCACCGCACC 3`”,

1b. Starter antysensowny R1 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - PCR1:

„5` CAGGCACATGCTGCCATGGCCA 3`”,

2a. Starter sensowny F2 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - PCR2:

„5` GAACACGAATTCCAGGAGGCAGGC 3`”,

2b. Starter antysensowny R2 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - PCR2:

„5` GGAGGCTCAGTGAGCACATAGCC 3`”,

3a. Starter sensowny F3 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - PCR3:

„5` CACATTGGCGGTCACATAAAGGTGAGG 3`”,

3b. Starter antysensowny R3 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - PCR3:

„5` TCCAGCCTAGGCGACAGAGCAAGA 3`”,

następnie w drugim etapie (reakcja minisekwencjonowania) stosuje się łącznie startery posiadające następujące sekwencje nukleotydowe:

1. Starter antysensowny SN1 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - SNP1 w uprzednio przygotowanej matrycy - produkcie PCR - PCR1:

„5` GACTGTGAGCCACTGCATCCAGCCTATTT 3`”

2. Starter sensowny SN2 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - SNP2 w uprzednio przygotowanej matrycy - produkcie PCR - PCR2:

„5` AAAAAGACTGGCCCAAGCATATGAACAAGCTGAA 3`”

3. Starter antysensowny SN3 pozwalający na uzyskanie produktu PCR - SNP3 w uprzednio przygotowanej matrycy - produkcie PCR - PCR3:

„5` AGACTGACTGTATCATTGAACCATTCTCTGTTGAATATT 3`”

Korzystnie jest gdy amplifikację 3 wybranych fragmentów DNA, zlokalizowanych w sekwencji regulatorowej genu ITGAM (PCR1, PCR2, PCR3), a następnie amplifikację 3 znajdujących się w ich sekwencji krótszych fragmentów DNA (SNP1, SNP2, SNP3) pozwalających na oznaczenie występujących w nich 3 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów prowadzi się jednocześnie.

Sposób według wynalazku pozwala na stosunkowo łatwe i wydajne otrzymywanie kopii matryc DNA zawierających miejsca przyłączenia starterów specyficznych dla fragmentów genu ITGAM. Stosowany w sposobie według wynalazku zbiór starterów (F1, R1, F2, R2, F3, R3) może być wykorzystywany, ze względu na swoją efektywność w reakcji multipleks PCR jako narzędzie służące do zamplifikowania wybranych fragmentów genu ITGAM (PCR1, PCR2, PCR3). Uzyskane fragmenty genu lub cDNA mogą następnie posłużyć do oznaczania wybranych SNPs genu ITGAM za pomocą minisekwencjonowania lub do otrzymania dużych ilości kopii fragmentów DNA genu ITGAM, które następnie można poddać różnym rodzajom analizy DNA. Ponadto, stosowany w sposobie według wynalazku zbiór starterów (SN1, SN2, SN3) może być wykorzystywany, ze względu na swoją efektywność w reakcji minisekwencjonowania jako narzędzie służące do zamplifikowania wybranych fragmentów genu ITGAM pozwalających na określenie wariantów polimorficznych 3 opisanych wyżej SNPs (SNP1, SNP2, SNP3).

Dodatkowo jednoczesne oznaczanie 3 wybranych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów pozwala na: skrócenie czasu oraz ilości odczynników potrzebnych do

przeprowadzenia genotypowania co tym samym przekłada się na redukcję kosztów analizy.

Celem uproszczenia w opisie i przykładzie używane są następujące skróty:

A – adenina

C – cytozyna

cDNA – DNA komplementarne do RNA

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

G – guanina

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy

PCR multipleks – metoda umożliwiająca amplifikację wielu SNP lub genów podczas jednej reakcji

pz – pary zasad

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

T – tymina

Wynalazek wyjaśniony jest bliżej w przykładzie, który jednak nie ogranicza jego zakresu.

Przykład 1. Reakcja multipleks PCR z wykorzystaniem unikalnego zestawu starterów (F1, R1, F2, R2, F3, R3) do amplifikacji specyficznych sekwencji DNA (PCR1, PCR2, PCR3) używanych następnie wraz z kolejnym unikalnym zestawem starterów (SN1, SN2, SN3) jako matryce w reakcji minisekwencjonowania służącej do oznaczania 3 wybranych SNPs genu ITGAM (SNP1, SNP2, SNP3).

Etap I – *uzyskanie produktów PCR w reakcji multipleks PCR (PCR1, PCR2, PCR3)*

W celu przeprowadzenia reakcji niezbędne były:

- 1) Wyizolowany z materiału biologicznego ludzki DNA.
- 2) Unikalna mieszanina reakcyjna zawierająca wymienione wyżej startery oraz inne odczynniki chemiczne w odpowiednich proporcjach.
- 3) Termocykler z możliwością ustawienia optymalnych warunków termicznych.

Reakcję multipleks PCR w wariacie do powielania wybranych fragmentów genu ITGAM według wynalazku prowadzono przy użyciu opisanych wyżej 6 starterów (F1, F2, F3, R1, R2, R3). W próbówce PCR 200 μ l przygotowano odpowiednią mieszaninę reakcyjną o objętości 25 μ l dodając kolejno: bufor Taq (z dodatkiem KCl/ bez MgCl₂), mieszaninę nukleotydów (dNTP mix), roztwór MgCl₂, termostabilną polimerazę Taq DNA oraz startery: sensowne (F1, F2, F3), antysensowne (R1, R2, R3), wyizolowane DNA, w proporcjach podanych w tabeli 1. Następnie, próbówki z przygotowaną mieszaniną przeniesiono do termocyklera i ustawiono program składający się z 6 etapów: wstępnej denaturacji DNA, denaturacji właściwej, przyłączania starterów, wydłużania produktu PCR, końcowego wydłużania produktu PCR, chłodzenia próbki. Reakcja prowadzona jest cyklicznie od etapu właściwej denaturacji do etapu wydłużania produktu PCR 33 razy w warunkach temperaturowych podanych w tabeli 2. Po zakończeniu reakcji otrzymane produkty PCR (PCR1: 201 pz; PCR2: 294pz; PCR3: 316 pz) rozdzielono elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym.

Na skutek rozdziału elektroforetycznego w świetle UV widoczne są 3 prążki o odpowiedniej długości ocenianej względem markera wielkości. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów multipleksowej reakcji PCR powstałych przy użyciu zaprojektowanej mieszaniny starterów (F1, F2, F3, R1, R2, R3) przedstawia Fig. 1, gdzie otrzymano po 3 produkty PCR dla różnych 9 próbek DNA.

W załączonej tabeli 1 przedstawiono proporcje odczynników stosowanych podczas powielania wybranych fragmentów genu ITGAM w reakcji multipleks PCR, zaś w tabeli 2 warunki temperaturowe jej prowadzenia.

Tabela 1. Proporcje odczynników stosowanych podczas powielania 3 wybranych fragmentów genu ITGAM w reakcji multipleks PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej (stężenie)	ilość
Bufor Taq (10x)	3 μ l
Mieszanina nukleotydów (2 mmol/ μ l)	3 μ l
Jony Mg ²⁺ (25 mmol/ μ l)	3,6 μ l
Polimeraza Taq DNA (5U/ μ l)	0,14 μ l
Startery F1, F2, F3 (po 100 pmol/ μ l)	3x 0,5 – 1,5 μ l
Startery R1, R2, R3 (po 100 pmol/ μ l)	3x 0,5 – 1,5 μ l
Woda wolna od nukleaz	11,26 μ l
DNA (20-200ng/ μ l)	1 μ l
Suma	25 μ l

Tabela 2. Warunki temperaturowe prowadzenia reakcji multipleks PCR w wariacie przystosowanym do powielania 3 wybranych fragmentów genu ITGAM. (Etapy prowadzone cyklicznie wyróżniono pogrubioną czcionką).

Etap	Temp.	Czas	Liczba cykli
1. Wstępna denaturacja DNA	96°C	8 min.	-
2. Właściwa denaturacja DNA	96 °C	30 sek.	33
3. Przyłączanie starterów	61 °C	30 sek.	
4. Wydłużanie produktu PCR	72 °C	45 sek.	
5. Końcowe wydłużanie produktu PCR	72 °C	12 min.	-
6. Chłodzenie próbki	4 °C	∞	-

Etap II – *uzyskanie produktów PCR w reakcji minisekwencjonowania (SNP1, SNP2, SNP3)*

W celu przeprowadzenia reakcji niezbędne były:

- 1) Przygotowane uprzednio produkty PCR (PCR1, PCR2, PCR3).
- 2) Unikalna mieszanina reakcyjna zawierająca wymienione wyżej startery oraz inne odczynniki chemiczne w odpowiednich proporcjach.
- 3) Termocykler z możliwością ustawienia optymalnych warunków termicznych.
- 4) Sekwenator umożliwiający przeprowadzenie elektroforezy kapilarnej (wraz z odpowiednim oprogramowaniem).

Reakcją poprzedzającą właściwe minisekwencjonowanie jest enzymatyczne oczyszczanie produktów (PCR1, PCR2, PCR3) uzyskanych na drodze multipleks PCR za pomocą ExoSAP (ang. exonuclease I - shrimp alkaline phosphatase) (Affymetrix/USB, USA). Do 5 μ l próbki zawierającej produkty PCR dodaje się 2 μ l mieszaniny ExoSAP. Oczyszczanie prowadzi się termocyklerze w temperaturze 37°C przez 15 minut (reakcję kończy 15 minutowa inaktywacja w temperaturze 80°C). Oczyszczone produkty stanowią matryce dla właściwej reakcji minisekwencjonowania prowadzonej w odpowiednio zaprogramowanym termocyklerze zgodnie z przedstawionymi w tabeli 3 progami temperaturowymi.

Reakcję minisekwencjonowania w wariacie do powielania wybranych fragmentów genu ITGAM (SNP1, SNP2, SNP3) według wynalazku prowadzi się przy użyciu opisanych wyżej 3 starterów (SN1, SN2, SN3). W próbówce PCR 200 μ l przygotowano odpowiednią mieszaninę reakcyjną o objętości 10 μ l dodając kolejno: 3 μ l mieszaniny oczyszczonych produktów multipleks PCR, 5 μ l głównej mieszaniny reakcyjnej multipleks SNaPshot™ PCR (Life Technologies, USA), 1 μ l mieszaniny specjalnie zaprojektowanych starterów specyficznych dla badanych SNPs (SN1, SN2, SN3) oraz 1 μ l wody wolnej od nukleaz. Następnie przenosi się mieszaninę do termocyklera i ustawia program składający się z 4 etapów: denaturacji DNA, przyłączania starterów, wydłużania produktu PCR, chłodzenia próbki. Reakcja prowadzona jest cyklicznie od etapu denaturacji DNA do etapu wydłużania produktu PCR 25 razy w warunkach temperaturowych podanych w tabeli 3. Po zakończeniu reakcji minisekwencjonowania prowadzi się oczyszczanie uzyskanych produktów. Do 7 μ l produktów minisekwencjonowania dodaje się 3 μ l

mieszaniny SAP (2 μ l Buforu i 1 μ l SAP) służącej do oczyszczania enzymatycznego (Affymetrix/USB, USA). Reakcję prowadzi się w termocyklerze w temperaturze 37°C przez 55 minut (reakcję kończy 15 minutowa inaktywacja w temperaturze 65°C). Po oczyszczeniu do 3 μ l produktów minisekwencjonowania dodaje się 7 μ l formamidu i poddaje się 3 minutowej denaturacji w 96°C w termocyklerze. Otrzymane w reakcji minisekwencjonowania oczyszczone i zdenaturowane produkty (wydłużone o 1 nukleotyd startery SN1, Sn2, SN3) rozdziela się następnie za pomocą elektroforezy kapilarnej (np. na sekwenatorze 3130 Genetic Analyzer; Life Technologies, USA). Rozdział prowadzi się ok. 20 minut na kolumnach kapilarnych (np. o długości 36 cm wypełnionych polimerem POP-4). Wewnętrzny standard wielkości (0,5 μ l na każdą próbkę) stanowi przygotowana przez producenta gotowa mieszanina fragmentów różnej wielkości – GeneScan™ 120 LIZ (Life Technologies, USA). Wyniki analizuje się za pomocą odpowiedniego oprogramowania (np. GeneMapper® Software Version 4.0 oraz SNaPshot® Kit Analysis; Life Technologies, USA), co pokazano w postaci elektroforegramów pikowych na Fig. 2.

Tabela 3. Progi temperaturowe reakcji minisekwencjonowania.

Lp.	Etap	Próg temperaturowy (°C)	Czas (sek.)	Liczba cykli
1	Denaturacja	96	10	25
2	Hybrydyzacja ze starterami	50	5	
3	Wydłużanie produktów SNaPshot® PCR	56	30	
4	Chłodzenie	4	∞	-

Literatura:

1. Rosetti F, de la Cruz A, Crispín JC. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2019;31(2):185-192. doi:10.1097/BOR.0000000000000572.
2. Fan Y, Li LH, Pan HF, Tao JH, Sun ZQ, Ye DQ. Association of ITGAM polymorphism with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(3):271-275. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03776.x.
3. Maiti AK, Kim-Howard X, Motghare P, et al. Combined protein- and nucleic acid-level effects of rs1143679 (R77H), a lupus-predisposing variant within ITGAM. *Hum Mol Genet.* 2014;23(15):4161-4176. doi:10.1093/hmg/ddu106.
4. Gorenc M, Kozjek NR, Strojjan P. Malnutrition and cachexia in patients with head and neck cancer treated with (chemo)radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2015;20(4):249-258. doi:10.1016/j.rpor.2015.03.001.
5. Gřiva, M. Cardiac cachexia – Up-to-date 2015. *Cor Vasa* 2016, 58, e431–e438, doi:10.1016/j.crvasa.2015.08.003.
6. Okoshi MP, Capalbo RV, Romeiro FG, Okoshi K. Cardiac Cachexia: Perspectives for Prevention and Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2017;108(1):74-80. doi:10.5935/abc.20160142.
7. Sobieszek G, Powrózek T, Mazurek M, Skwarek-Dziekanowska A, Małeczka-Massalska T. Electrical and Hormonal Biomarkers in Cachectic Elderly Women with Chronic Heart Failure. *J Clin Med.* 2020;9(4):1021. Published 2020 Apr 4. doi:10.3390/jcm9041021.
8. Gorenc M, Kozjek NR, Strojjan P. Malnutrition and cachexia in patients with head and neck cancer treated with (chemo)radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2015;20(4):249-258. doi:10.1016/j.rpor.2015.03.001.
9. Meza-Valderrama D, Marco E, Dávalos-Yerovi V, et al. Sarcopenia, Malnutrition, and Cachexia: Adapting Definitions and Terminology of Nutritional Disorders in Older People with Cancer. *Nutrients.* 2021;13(3):761. Published 2021 Feb 26. doi:10.3390/nu13030761.
10. Santarpia L, Contaldo F, Pasanisi F. Nutritional screening and early treatment of malnutrition in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2011;2(1):27-35. doi:10.1007/s13539-011-0022-x.

11. Sobieszek G, Mlak R, Powrózek T, et al. Polymorphism of the ITGAM gene (rs7193943) and bioelectric impedance analysis as potential predictors of cachexia in chronic heart failure. *Sci Rep.* 2021;11(1):20145. Published 2021 Oct 11. doi:10.1038/s41598-021-99719-6.
12. Mazurek M, Mlak R, Homa-Mlak I, et al. Polymorphism of The Regulatory Region of the ITGAM Gene (-323G>A) as a Novel Predictor of a Poor Nutritional Status in Head and Neck Cancer Patients Subjected to Intensity-Modulated Radiation Therapy. *J Clin Med.* 2020;9(12):4041. Published 2020 Dec 14. doi:10.3390/jcm9124041.
13. Han S, Kim-Howard X, Deshmukh H, et al. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin-alpha-M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE). *Hum Mol Genet.* 2009;18(6):1171-1180. doi:10.1093/hmg/ddp007.