УДК 546-022.53:57.088:616.65-097.1:611.018.1.08

К.И. Бражник[1], З.А. Соколова[1; 2], М.А. Барышникова[1; 2], Р.С. Билан[1], И.Р. Набиев[1; 3], А.В. Суханова[1; 3]

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСПЕНЗИОННОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР, КОДИРОВАННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ НАНОКРИСТАЛЛАМИ, ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ СВОБОДНОГО И ОБЩЕГО ПСА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

[1]Национальный Исследовательский Ядерный Университет «МИФИ», Москва
[2]ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва
[3]Лаборатория по исследованиям в области нанонаук – LRN, EA4682, Университет г. Реймс, Шампань-Арденны, Франция

Контактная информация
Суханова Алена Владимировна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории по исследованиям в области нанонаук
адрес: 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France; тел. +33-6-25-68-36-63
e-mail: alyona.sukhanova@univ-reims.fr

Статья поступила: 21.09.2015, принята к печати 27.11.2015.

Резюме

Многопараметрические суспензионные системы последнего поколения способны обеспечить высокоточный и одновременный количественный анализ специфических маркеров различных заболеваний в клинических пробах биологических жидкостей организма человека. Разработанные нами суспензионные микрочипы на основе микросфер, кодированных флуоресцентными НК, имеют преимущества по сравнению с существующими аналогами с точки зрения улучшенных многопараметрических возможностей, оптических свойств, простоты и дешевизны исполнения анализа. Мы адаптировали такую суспензионную систему для одновременного количественного определения двух форм ПСА в сыворотке крови человека в формате многопараметрического анализа с помощью классической проточной цитометрии. В настоящем исследовании оценены основные аналитические характеристики, такие как аналитическая (предельная) чувствительность, воспроизводимость, достоверность и точность анализа, линейные диапазоны определяемых концентраций онкомаркеров и потенциал разработанной системы по сравнению со стандартным иммуноферментным методом ELISA. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что разработанная диагностическая система позволяет с высокой точностью, аккуратностью и достоверностью одновременно определять количественное содержание двух форм ПСА в образцах сыворотки крови пациентов.

Ключевые слова: квантовые точки, простатический специфический антиген, суспензионные микрочипы, многопараметрический анализ, проточная цитометрия.

K.I. Brazhnik[1], Z.A. Sokolova[1; 2], M.A. Baryshnikova[1; 2], R.S. Bilan[1], I.R. Nabiev[1; 3], A.V. Sukhanova[1; 3]

ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF FLUORESCENT SUSPENSION NANOCRYSTAL-ENCODED MICROARRAY ADAPTED FOR SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETECTION OF FREE AND TOTAL PSA IN SERUM SAMPLES

[1]National Research Nuclear University «Moscow Engineering Physics Institute», Moscow
[2]FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Russian Federation, Moscow
[3]Laboratory of Research in Nanosciences, Université de Reims Champagne-Ardenne, France

Abstract

Multiplexed suspension systems of anew generation are capable to provide precise quantitative profiling of multipledisease-specific markers in human body fluids. We have developed suspension microarrays based on microbeads encoded with fluorescent nanocrystals, that show undeniable advantages overavailable analogues in terms of improved multiplexing capabilities, physical and optical properties, low cost and simplicity of analysisperformance. We have adapted QD-encoded suspension microarrays for the simultaneous detection of two forms of prostate-specific antigen (PSA) in human serum by means of classical flow cytometry. In the present study, we describe in detail the designed system properties including evaluation the microarray for quantitative analysis of serum markers in comparison to standard clinical approach ELISA, as well asestimation of the most important analytical characteristics, such as analytic sensitivity (limit of detection), reproducibility, reliability and accuracy of the analysis, the linear rangesfor detectable-marker concentrations. Experimental data suggested that the developed diagnostic system quantifies two forms of PSA in blood serum samples of patients with high accuracy, precision and reliability.

Key words: fluorescent semiconductor nanocrystals, quantum dots, cancer markers, prostate-specific antigen, microbeads, suspension microarrays, multiplexed analysis, flow cytometry.

Введение

Стандартный метод ИФА признан «золотым стандартом» лабораторной диагностики онкологических заболеваний и широко используется в клинической практике для количественной детекции растворимых онкомаркеров в биологических жидкостях организма человека. Такой метод обладает высокой чувствительностью, точностью и эффективностью анализа, однако позволяет единовременно детектировать только один маркер в образце, а для последовательного анализа профиля маркеров становится дорогим, затратным по времени и требует больших объемов образцов [7; 17]. В настоящее время одним из основных аналитических методов для одновременного определения полного профиля растворимых маркеров в клиническом образце является многопараметрический анализ с использованием планарных микрочипов. Микрочипы, представляющие собой массивы индивидуальных микроэлементов, содержащих различные зонды (ДНК, РНК, олигонуклеотиды, белки, пептиды, сахариды и др.), позволяют проводить многопараметрический анализ [4; 11; 12]. Тем не менее, зачастую свойства неподвижного планарного носителя в формате микрочипа значительно снижают чувствительность, эффективность и скорость детекции, а также ограничивают выбор анализируемых параметров [8; 14; 15].

В последнее время ведутся активные разработки по созданию многопараметрической суспензионной системы на основе кодированных микрочастиц с иммобилизованными на их поверхности биологическими зондами [2; 16]. Такие пространственные системы детекции имеют значительные преимущества перед твердофазными планарными микрочипами.

Они характеризуются эффективной кинетикой связывания; обладают расширенным линейным диапазоном определяемых концентраций; позволяют с высокой чувствительностью и точностью измерять уровень нескольких растворимых маркеров одновременно в одном биологическом образце с помощью проточной цитометрии [9; 18].

Разработка суспензионных микрочипов в клинической диагностике имеет важное медицинское значение, т.к. подобные системы для пространственного анализа образцов биологических жидкостей малого объема являются экономичной и эффективной альтернативой традиционным ИФА-системам. Принцип количественной детекции онкомаркеров в сыворотке крови человека основан на взаимодействии определяемого АГ с распознающими молекулами, химически связанными с поверхностью оптически кодированных микрочастиц и с флуоресцентно мечеными детекторными молекулами. Анализ флуоресцентного сигнала проводится с помощью классической проточной цитометрии [1; 6]. Каждому анализируемому маркеру присваивается индивидуальный оптический код популяции микросфер, который помогает количественно дифференцировать данный маркер в тестируемом биологическом образце. При смешивании нескольких популяций флуоресцентных микросфер, оптические коды которых присвоены разным биомолекулам, реализуется возможность многопараметрического количественного определения профиля специфических маркеров в одном образце [1; 6; 13; 18].

Ранее были продемонстрированы преимущества таких суспензионных микрочипов по сравнению с существующими аналогами с точки зрения улучшенных многопараметрических возможностей, оптических свойств, простоты и дешевизны исполнения анализа [1; 3; 5; 6]. Однако одним из существенных моментов в процессе создания новой диагностической системы является ее валидация с использованием клинического материала. Важны также оценка аналитических характеристик и сравнительный анализ разрабатываемой системы со стандартными методами (ИФА) с целью дальнейшего внедрения в клинико-лабораторную практику.

Цель исследования – оценка аналитических характеристик суспензионной системы нового поколения на основе микросфер, кодированных флуоресцентными НК, для многопараметрической детекции онкомаркеров в сыворотке крови человека.

Материалы и методы

Образцы сыворотки крови здоровых доноров и больных РПЖ были предоставлены отделением онкоурологии НИИ КО и отделом клинической иммунологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Общее количество образцов сыворотки крови человека для количественного определения двух форм (общей и свободной) ПСА составило 68 (табл. 1).

Стабильные водорастворимые флуоресцентные НК и кодированные микросферы были получены в соответствии с описанными ранее протоколами [16; 21; 22] в лаборатории нано-биоинженерии НИЯУ «МИФИ».

Многопараметрический иммунодиагностический анализ образцов сыворотки с помощью суспензионной системы флуоресцентных микросфер

Количественная детекция информативных онкомаркеров с помощью разработанной суспензионной системы микросфер, кодированных КТ, основывалось на формировании иммунодиагностического комплекса, состоящего из улавливающего АГ-специфического АТ, связанного на поверхности микрочастицы с помощью прямой конъюгации детектируемого АГ (онкомаркера); биотинилированного детекторного АГ-специфического АТ; визуа-

лизирующего конъюгата стрептавидина с органическим флуоресцентным красителем (Tri-COLOR, TC; табл. 2).

Флуоресцентные АГ-специфические микросферы последовательно инкубировались со всеми элементами иммунодиагностического комплекса. Все АГ-специфические микросферы были откалиброваны с помощью набора стандартов, содержащих известные концентрации соответствующего АГ (Fujirebio Diagnostics, Швеция), на основании этих данных были построены калибровочные кривые для определения концентрации каждого АГ в сыворотке крови.

Суспензионные смеси микросфер инкубировали с 50 мкл образца сыворотки крови, затем с биотинилированными детекторными АТ, и визуализировали иммунодиагностические комплексы с помощью конъюгата стрептавидина с флуоресцентным красителем Tri-COLOR. Полученные образцы анализировали с помощью проточной цитометрии (FACSCantoII, Becton Dickinson, США).

Твердофазный иммуноферментный анализ на 96-луночном планшете (ИФА-наборы)

Концентрации опухолевых маркеров в исследуемых образцах сыворотки крови, измеренные с помощью разработанной суспензионной системы, кодированных КТ, сопоставляли с концентрациями, измеренными методом ИФА, с использованием диагностических наборов фирмы «Fujirebio Diagnostics» (Швеция) для свободного (кат. № 350-10) и общего (кат. № 340-10) ПСА согласно прилагающимся к наборам инструкциям.

Статистика

Результаты измерения концентрации опухолевых маркеров с помощью разработанной суспензионной системы микросфер, кодированных КТ, и «золотого стандарта» диагностики (ИФА, «Fujirebio Diagnostics», Швеция) были обработаны с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010 и OriginPro (версия 8.5 SR1).

Для установления связи между результатами измерений уровней опухолевых маркеров в сравниваемых тест-системах применяли регрессионный анализ и коэффициент корреляции.

Результаты и обсуждения

При оценке аналитических характеристик руководствовались рекомендациями и требованиями, предъявляемыми к клинико-диагностическим методам [10], а также клиническими протоколами, используемыми при разработке и применении стандартных иммунометрических диагностических систем в формате 96-луночного планшета, а именно одностадийного «сэндвич»-иммуноанализа как наиболее простого и технологически приемлемого для клинического использования.

Исследованные аналитические характеристики включали: изучение стабильности (воспроизводимости) калибровочной кривой, определение аналитической (предельной) чувствительности, проведение специальных тестов на достоверность, надежность и точность определения маркера (тесты на «открытие» и линейность).

Воспроизводимость анализа

Воспроизводимость калибровочных кривых оценивали внутри одного эксперимента, а также в серии независимых экспериментов с помощью КВ, равного отношению стандартного отклонения к средней величине, выраженному в процентах и СО. Воспроизводимость калибровочной кривой в линейном диапазоне определяемых концентраций 0–10 нг/мл и 0–60 нг/мл для свободного и общего ПСА соответственно, полученных внутри одного эксперимента, была высокой, КВ 0–9 % (рис. 1). В серии трех независимых экспериментов на микросферах, конъюгированных с новыми порциями АГ-специфических АТ, воспроизводимость оказалась ниже, КВ составил 3–31 % (рис. 2).

Это объясняется различиями в количестве эффективно конъюгированных АГ-специфических АТ на поверхности микросфер, а также в количестве микросфер, используемых для анализа образца. В каждом независимом эксперименте микросферы, конъюгированные с новыми порциями АТ, калибровались заново с помощью стандартов, и сывороточные концентрации свободного и общего ПСА определялись с помощью соответствующих калибровочных кривых (табл. 3).

Воспроизводимость измерений уровней общего и свободного ПСА в образцах сыворотки крови была удовлетворительной внутри одного эксперимента. КВ не выходил за пределы допустимых 10 % при концентрациях ПСА общего 0,5–60 нг/мл и ПСА свободного 0,07–10 нг/мл.

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность определяется как наименьшее количество вещества, которое можно достоверно детектировать с помощью диагностического метода.

Предельные нижние значения концентраций сывороточных онкомаркеров, определяемых с помощью разработанной суспензионной системы, составили 0,07 нг/мл для свободного и 0,12 нг/мл для общего ПСА, что сопоставимо с чувствительностью стандартных иммуноферментных систем.

Линейный диапазон определяемых концентраций

С помощью разработанной диагностической системы на всех участках калибровочной кривой оценивался линейный диапазон определяемых концентраций в эксперименте с серией последовательных двукратных разведений образцов сыворотки (тест на линейность).

Для этого были приготовлены и проанализированы серийные разведения образцов сыворотки (в диапазоне от 1 : 4 до 1 : 500) с высокими концентрациями 239,4 и 309,7 нг/мл общего ПСА.

Таблица 1

Образцы сыворотки крови для количественной детекции свободного и общего ПСА

№ п/п	Исследуемые группы	Средний возраст, лет	n больных	n образцов сыворотки
1	Здоровые доноры	30,0	6	6
2	Больные РПЖ	67,0	29	29
3	Больные ДГПЖ	66,0	33	33
ВСЕГО				68

Таблица 2

Оптические коды и состав специфических иммунодиагностических комплексов на частице для многопараметрической детекции онкомаркеров

Популяция микросфер	Анализируемый онкомаркер	Улавливающие АГ-специфические АТ	Детекторные АГ-специфические АТ
4,08 мкм, КТ 515 нм	Свободный ПСА	PSA30 (Fujirebio)	PSA66 (Fujirebio)
4,08 мкм, КТ 581 нм	Общий ПСА	PSA10 (Fujirebio)	PSA66 (Fujirebio)

Таблица 3

Воспроизводимость данных анализа образцов сыворотки крови в трех независимых экспериментах

Образец	Свободный ПСА, нг/мл			Общий ПСА, нг/мл			% свободного ПСА		
	среднее	СО	КВ, %	среднее	СО	КВ, %	среднее	СО	КВ, %
А	1,20	0,06	5,2	16,17	1,44	8,9	7,42	0,84	6,6
Б	0,58	0,21	36,9	3,25	0,84	25,9	17,85	1,07	6,8

Таблица 4

Оценка надежности определения уровня свободного и общего ПСА в смешанных образцах сыворотки

Образец сыворотки	Эксперимент 1		Эксперимент 2	
	Свободный ПСА, нг/мл	Общий ПСА, нг/мл	Свободный ПСА, нг/мл	Общий ПСА, нг/мл
В	1,152	15,15	1,24	9,39
Г	0,473	3,84	0,44	2,65
Смесь (В+Г) (измеренная)	0,74	8,8	0,73	5,5
Смесь (В+Г) (расчетная)	0,8125	9,495	0,84	6,02
Эффективность детекции, %	91,1	92,7	86,9	91,4
Эффективность детекции, % (среднее для двух экспериментов): Свободный ПСА – 89%; Общий ПСА – 92%				

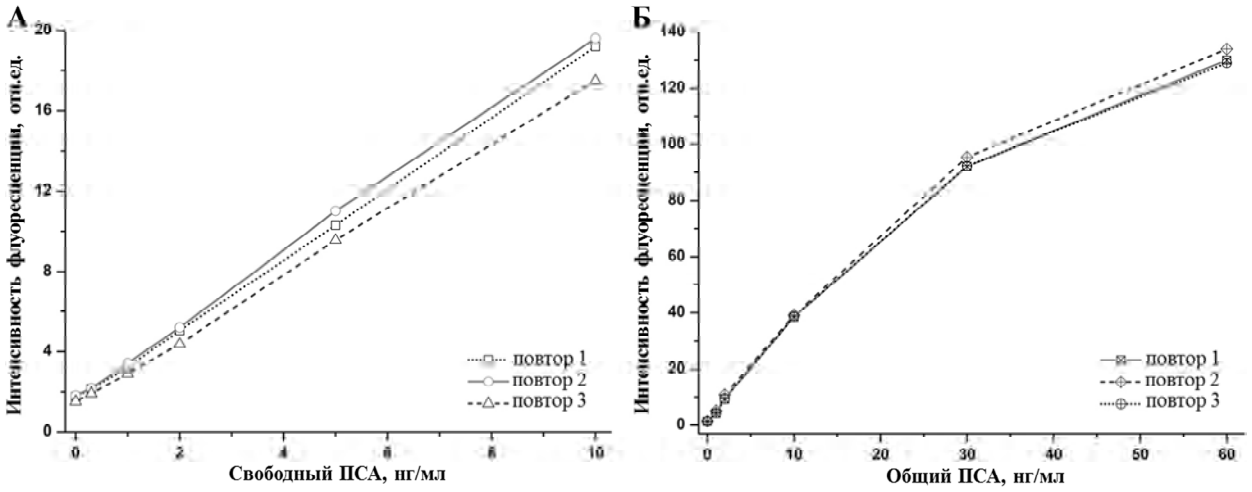


Рис. 1. Калибровочные кривые в трех повторах внутри одного эксперимента для количественного определения свободного (А) и общего (Б) ПСА.

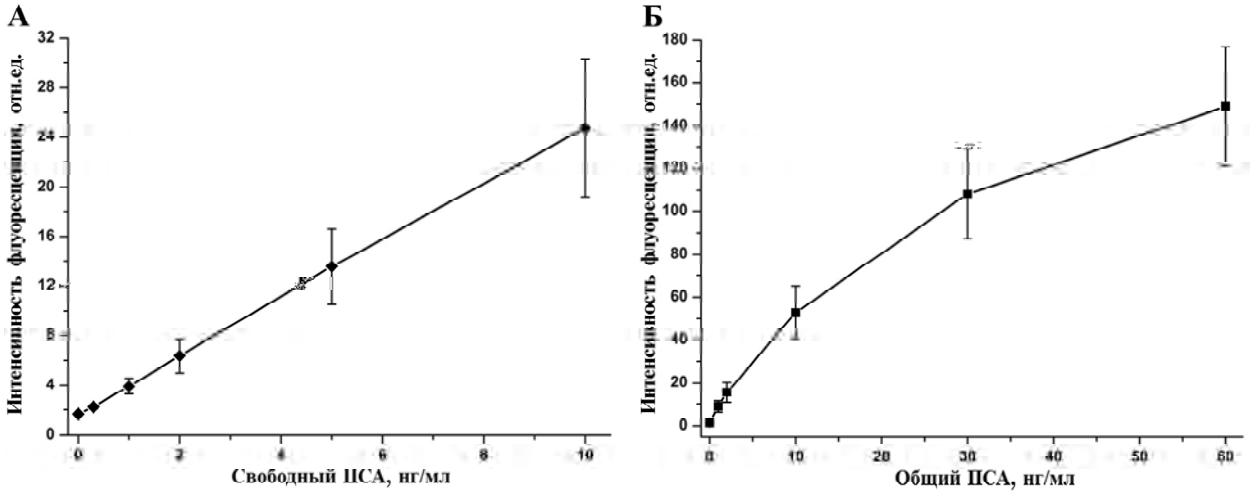


Рис. 2. Калибровочные кривые в серии трех независимых экспериментов для количественного определения свободного (А) и общего (Б) ПСА

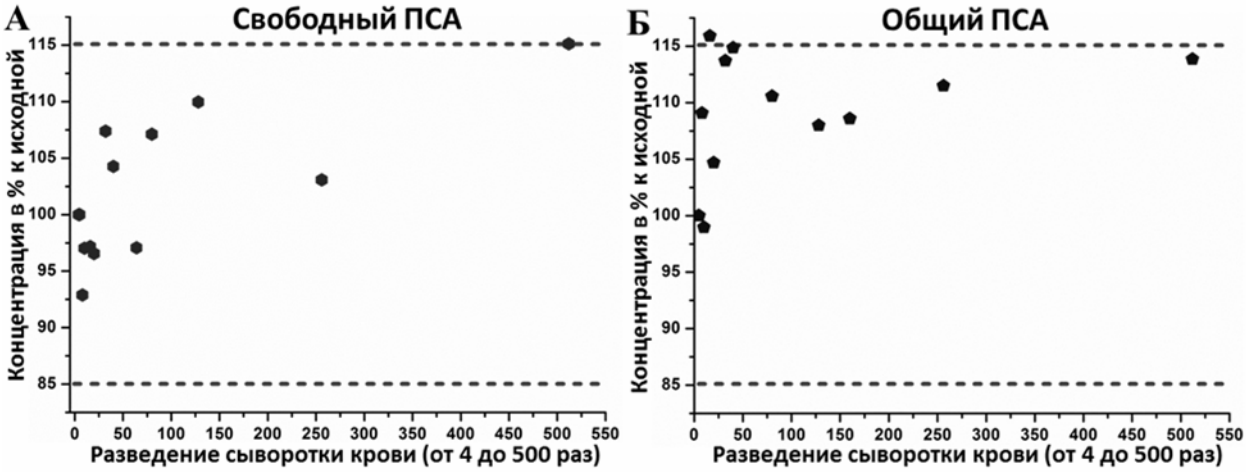
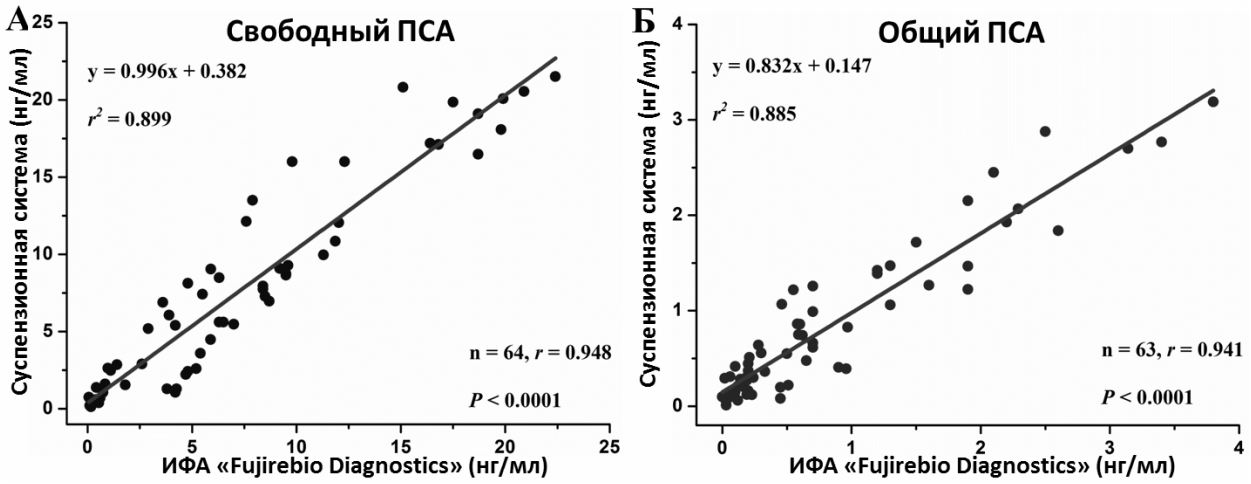


Рис. 3. Тест на линейность с использованием образца сыворотки крови с высоким уровнем ПСА общего (А) и свободного ПСА (Б)



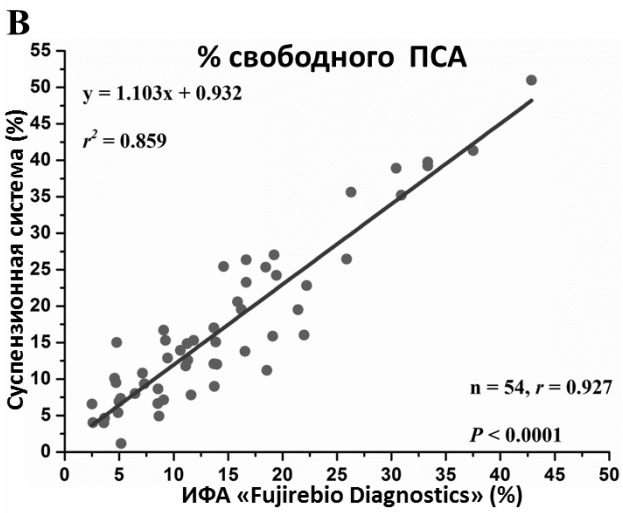


Рис. 4. Линии регрессии уровней свободного ПСА (А), общего ПСА (Б) и рассчитанного процентного содержания ПСА (В), измеренных с помощью диагностической суспензионной системы на основе микросфер, кодированных КТ, и ИФА «Fujirebio Diagnostics.

Конечную концентрацию каждого маркера оценивали путем умножения концентрации, измеренной в разведенном образце, на разведение и выражали в процентах относительно исходного образца (рис. 3, А, Б).

Поскольку концентрации свободного и общего ПСА в неразведенных образцах в 4–5 раз превышали максимальную концентрацию онкомаркера в калибровочной пробе и не могли быть установлены по калибровочной кривой, за исходные концентрации были приняты значения, полученные при разведении образцов в 4–5 раз (100 %).

При одновременном определении концентраций свободного и общего ПСА в приготовленных образцах наблюдалась достоверная линейная корреляция между измеренным и расчетными значениями, не отличавшимися более, чем на 15 % в динамических диапазонах 0,07–7,5 нг/мл для свободного и 0,5–60 нг/мл для общего ПСА.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная диагностическая суспензионная система на основе флуоресцентных микросфер, предназначенная для одновременного определения двух форм ПСА, позволяет получать достоверные результаты теста на линейность в диапазоне использованных коммерческих калибровочных стандартов при разведении образца сыворотки крови с высоким содержанием ПСА.

Тест на «открытие»

Данный тест позволяет оценить достоверность и эффективность диагностической системы для количественной детекции анализируемых маркеров.

В эксперименте использовали сыворотки крови человека с различными концентрациями свободного и общего ПСА, предварительно измеренными с помощью разработанной диагностической суспензионной системы. Образцы смешивались в равных соотношениях, и эта смесь также анализировалась с помощью разработанной диагностической системы.

Сравнивали ожидаемую концентрацию, которая должна была получиться при смешивании сывороток с известными концентрациями, с концентрацией, определенной экспериментально.

Сравнительный анализ показал, что различие расчетных и измеренных значений концентраций онкомаркеров в смеси образцов сыворотки составляло не более 11 % для свободного и 8 % для общего ПСА (табл. 4), что удовлетворяет требованиям для диагностических систем.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что разработанная диагностическая система позволяет с высокой точностью определять количественное содержание ПСА в образцах сыворотки крови.

Эффективность количественной детекции онкомаркеров в смеси образцов составляет 100±13,1 % для свободного и 100±8,6 % для общего ПСА.

Сравнение результатов измерения двух форм ПСА в суспензионной системе на основе микросфер и ИФА «Fujirebio Diagnostics» Регрессионный анализ

В данном исследовании на клиническом материале (68 образцов сыворотки крови) проведено измерение уровней ПСА общего и ПСА свободного в суспензионной системе и сопоставление их с данными, полученными для этих же образцов в традиционной системе ИФА – «Fujirebio Diagnostics».

Показана высокая степень корреляции результатов измерений, полученных с помощью разработанной многопараметрической суспензионной системы на основе флуоресцентных микросфер и стандартного ИФА.

Коэффициенты корреляции r составляли 0,948 для свободного и 0,941 для общего ПСА. Уровень значимости корреляции был высоким, $p<0,0001$.

На основании данных определения сывороточных концентраций ПСА с помощью двух диагностических методов были построены линии регрессии, свидетельствующие о близкой эквивалентности методов (рис. 4, А, Б, В).

Заключение

В настоящее время нанотехнологии, основанные на использовании НК и микросфер, кодированных флуоресцентными КТ, находятся на этапе развития для дальнейшей интеграции в клинико-диагностическую практику.

Ранее нами были получены первые результаты применения таких систем в протеомике для идентификации ауто-АТ в сыворотке крови пациентов [20].

Эти исследования открыли широкие перспективы для применения разработанных суспензионных микрочипов для многопараметрической

детекции целого спектра растворимых маркеров белковой природы с высокой точностью и чувствительностью.

С помощью диагностической суспензионной системы на основе микросфер, кодированных КТ, можно одновременно детектировать минимальные количества различных онкомаркеров в сыворотке крови человека [19].

Нами была разработана такая многопараметрическая суспензионная система нового поколения адаптированная для количественной детекции двух форм ПСА — маркеров РПЖ в сыворотке крови человека [1; 6].

Были продемонстрированы возможности подобных суспензионных микрочипов с точки зрения информативности и полноты анализа спектра специфических онкомаркеров, простоты и доступности проведения анализа.

Аналитические характеристики разработанных суспензионных систем для многопараметрического анализа были сопоставимы с характеристиками стандартного иммуноферментного метода.

Таким образом, разработанные суспензионные микрочипы, кодированные КТ, позволяют одновременно проводить количественные измерения двух форм ПСА.

Данная работа финансировалась Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках программы привлечения ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования (проф. Игорь Руфаилович Набиев, грант № 11.G34.31.0050, www.lnbe.mephi.ru).

Литература

1. *Бражник К.И.* Многопараметрический анализ сывороточных онкомаркеров с помощью суспензионных систем на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами. – Дис. … канд. биол. наук. – Москва, 2015.
2. *Бражник К.И., Барышникова М.А., Соколова З.А. и др.* Новые направления в исследовании и ранней диагностике рака с применением детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 11–24.
3. *Бражник К.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. и др.* Разработка суспензионных микрочипов на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, и принципы их использования для многопараметрической диагностики онкологических заболеваний // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 3–10.
4. *Blohm D.H., Guiseppi-Elie A.* New developments in microarray technology // CurrOpinBiotechnol. – 2001. – 12(1). – P. 41–7.
5. *Brazhnik K., Grinevich R., Efimov A. et al.* Development and potential applications of microarrays based on fluorescent nanocrystal-encoded beads for multiplexed cancer diagnostics // Proceedings of SPIE. Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care IV. – 2014. – 9129. – Article 91292C.
6. *Brazhnik K., Sokolova Z., Baryshnikova M. et al.*Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multiplexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples // Nanomedicine: NBM.– 2015. –doi: 10.1016/j.nano.2015.03.003.
7. *Dupont N.C., Wang K., Wadhwa P.D. et al.*Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants // J ReprodImmunol. – 2005. – 66(2). – P. 175–91.
8. *Ellington A.A., Kullo I.J., Bailey K.R. et al.* Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges // Clin Chem. – 2010. – 56(2). – P. 186–93.
9. *Elshal M.F., McCoy J.P.* Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA // Methods. – 2006. – 38(4). – P. 317–23.

10. *Fuzery A.K., Levin J., Chan M.M. et al.* Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges // Clin Proteomics. – 2013. – 10(1). – P. 13–27.
11. *Gershon D.* Microarray technology: an array of opportunities // Nature. – 2002. – 416(6883). – P. 885–91.
12. *Gonzalez-Gonzalez M., Jara-Acevedo R., Matarraz S. et al.* Nanotechniques in proteomics: protein microarrays and novel detection platforms // Eur J Pharm Sci. – 2012. – 45(4). – P. 499–506.
13. *Kellar K.L., Douglass J.P.* Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines // J Immunol Methods. – 2003. – 279(1–2). – P. 277–85.
14. *Kodadek T.* Protein microarrays: prospects and problems // Chem Biol. – 2001. – 8(2). – P. 105–15.
15. *Liotta L.A., Espina V., Mehta A.I. et al.*Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications // Cancer Cell. – 2003. – 3(4). – P. 317–25.
16. *Nabiev I., Sukhanova A., Artemyev M., Oleinikov V.* Fluorescent colloidal particles as a detection tools in biotechnology systems: In Colloidal nanoparticles in Biotechnology / Eds. by A. Elissari. – London-Singapore-NY: Wiley, 2008 – P. 133–68.
17. *Nolan J.P., Sklar L.A.* Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm // Trends Biotechnol. – 2002. – 20(1). – P. 9–12.
18. *Sturgeon C.M., Viljoen A.* Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk // Ann ClinBiochem. – 2011. – 48(Pt 5). – P. 418–32.
19. *Sukhanova A., Nabiev I.* Fluorescent nanocrystal-encoded microbeads for multiplexed cancer imaging and diagnosis // Crit Rev OncolHematol. – 2008. – 68(1). – P. 39–59.
20. *Sukhanova A., Susha A.S., Bek A. et al.*Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases // Nano Lett. – 2007. – 7(8). – P. 2322–7.
21. *Sukhanova A., Devy J., Venteo L. et al.* Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells // Anal Biochem. – 2004. – 324. – P. 60–7.
22. *Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Kisserli A. et al.* Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobes // Nanomedicine. – 2012. – 8. – P. 516–25.