ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2022, том 77, № 5, с. 406–411

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.07;543.054

АВТОМАТИЧЕСКОЕ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕТЫРЕХ КАРДИОМАРКЕРОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С КАРДИОПАТОЛОГИЯМИ

© 2022 г.
Н. Л. Нечаева[a], *, О. Н. Сорокина[a], Т. С. Константинова[a], А. Д. Васильева[a], Л. В. Юрина[a], Н. А. Бызова[b], А. Е. Бугрова[a], С. Н. Подойницын[a], А. В. Еременко[a], И. Н. Курочкин[a, c]

[a] *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук ул. Косыгина, 4, Москва, 110334 Россия*

[b] *Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук Ленинский просп., 33, стр. 2, Москва, 119071 Россия*

[c] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: laboratoria.ibcp@gmail.com*

Поступила в редакцию 23.06.2021 г.
После доработки 02.08.2021 г.
Принята к публикации 02.08.2021 г.

Предложен метод одновременного экспресс-определения четырех белков – кардиомаркеров (С-реактивный белок, цистатин С, миоглобин и Д-димер) в плазме крови пациентов с кардиопатологиями. Изменение концентрации каждого из белков в отдельности может указывать на определенные патологические процессы в организме человека, а одновременное повышение концентрации всех четырех маркеров свидетельствует о возможном развитии острой кардиопатологии. Экспресс-анализ основан на методе иммуномагнитной аффинной сепарации целевых белков из образцов крови с использованием флуоресцентной метки для каждого исследуемого белка. Предложенный метод автоматизирован и оптимизирован для определения физиологических и патологических концентраций целевых маркеров крови. Разработана автоматическая биоаналитическая платформа на основе предлагаемого метода, которая позволяет проводить экспресс-определение кардиомаркеров в 17 мкл плазмы крови за 14 мин.

Ключевые слова: кардиомаркер, флуоресцентный иммуноанализ, магнитные частицы, экспресс-анализ.

DOI: 10.31857/S0044450222050103

Широкий спектр заболеваний может демонстрировать сходные симптомы и для постановки точного диагноза требуется проведение дифференциальной диагностики патологического состояния. Так, например, можно перечислить целый ряд причин боли в груди. Они могут возникать в связи с заболеваниями сердца, легких, желудочно-кишечного тракта, и в этом случае важно как можно более точно определить происхождение боли. Одним из самых информативных видов анализа для диагностики является анализ крови на специфические маркеры (сердечно-сосудистые, воспалительные, почечные, онкологические и др.). Экспресс-тесты крови, доступные для индивидуального применения, или экспресс-анализ в больнице могут сделать предварительную диагностику более дифференцированной и эффективной. В клинической практике требуется быстрый и точный анализ крови на инфекционные маркеры, заболевания почек и сердца. Ранняя диагностика таких биомаркеров может значительно снизить риск возникновения возможных осложнений и упростить лечение и реабилитацию пациента. Четыре белка плазмы человека – С-реактивный белок (**СРБ**), цистатин С (**Цис-С**), миоглобин (**МГ**) и Д-димер (**Д-Дм**) – отражают воспалительный или тромбоэмболический статус пациента и играют роль кардиомаркеров [1, 2]. Миоглобин – цитоплазматический белок скелетных мышц и миокарда с молекулярной массой 17.9 кДа. Физиологическая концентрация МГ в крови составляет от 6 до 85 нг/мл [3]. Избыток МГ позволяет оценить разрушение мышечной ткани, динамику процесса и эффективность лечения. Устойчивый избыток МГ в крови указывает на его продолжающееся высвобожде-

ние из мышечной ткани, так как его полувыведение из крови (через почки) составляет около 9 мин [4]. Цистатин С – это низкомолекулярный (13.4 кДа) белок, ингибитор цистеиновых протеаз, который продуцируется всеми ядросодержащими клетками организма. Повышение уровня Цис-С в крови может указывать на умеренную почечную недостаточность и сердечно-сосудистую дисфункцию у пожилых пациентов [5]. Физиологический уровень Цис-С в плазме крови находится в диапазоне от 600 до 1200 нг/мл. С-реактивный белок – это белок с молекулярной массой 25 кДа, который участвует в воспалительных и иммунологических процессах. Физиологическая концентрация СРБ в плазме крови составляет около 1000 нг/мл, но может резко возрасти при острой фазе воспаления до 500 мкг/мл [6, 7]. Клинические исследования показали, что высокие значения СРБ (4.0–6.0 мкг/мл) связаны с риском сердечно-сосудистых дисфункций [8]. Д-димер представляет собой продукт разложения фибрина с молекулярной массой 180 кДа, уровень которого в крови увеличивается после фибринолиза. В клинической практике Д-Дм используется для контроля коагуляции и фибринолиза [9]. Физиологический диапазон Д-Дм составляет от 0 до 250 нг/мл [10]. Повышение концентрации Д-Дм указывает на активацию коагуляции (диссеминированное внутрисосудистое свертывание, тромбоз глубоких вен, легочная тромбоэмболия, массивное повреждение тканей или хирургическое вмешательство, сердечная недостаточность, опухолевые заболевания). И коагуляция, и фибринолиз приводят к увеличению уровня Д-Дм, в отличие от других подобных маркеров. Повышенное содержание каждого белка может указывать на серьезные проблемы со здоровьем, а их одновременное обнаружение позволит прояснить всю картину заболевания. Быстрое и точное одновременное определение этих четырех биомаркеров может упростить дифференциальную диагностику и выбрать корректную стратегию лечения.

Экспресс-определению сердечных биомаркеров в микрообъеме пробы посвящено немало работ. Так, описан [11] иммуносенсор для обнаружения Д-Дм в модельной системе с малым временем отклика (20 с), однако оно не включает затраты времени на промывку и регенерацию датчика. В работе [12] описан электрохимический биосенсор для определения МГ в 1 мкл неразбавленной плазмы в течение 30 мин. Этот иммуносенсор работает в широком диапазоне концентраций МГ – от значений, характерных для здоровых доноров, до типичных для пациентов с острым инфарктом миокарда. Тем не менее особый интерес представляют работы, в которых обсуждается одновременное определение нескольких биомаркеров.

Мультиплексное определение может быть реализовано с помощью маркировки аналитов разными маркерами [13]. Используя два разных маркера можно определять два разных аналита. Например, иммуноанализ с использованием антител, меченных хелатными комплексами европия(III) и самария(III), использовали для определения МГ и сердечного тропонина Т с последующим флуоресцентным детектированием методом флуориметрии с временным разрешением. Одновременное определение СРБ и Д-Дм в плазме крови человека проводят методом спектроскопии отражения с предварительной градуировкой с использованием биотинилированных антител [14]. Каждый шаг занимает 20 мин, таким образом, весь анализ смеси двух аналитов длится примерно 45 мин. Описано также определение нескольких кардиомаркеров менее чем за 30 мин, но только в модельной системе [15]. Креатинкиназу МВ, СРБ, Д-Дм и ассоциированный с беременностью протеин-А плазмы определяли одновременно в буферном растворе с помощью интегрированной акустической платформы. Иммунохроматографический анализ (**ИХА**) также показал убедительные результаты [16]. Авторы описали ИХА-тест для быстрой количественной оценки трех биомаркеров (тропонин I, белок, связывающий жирные кислоты, и СРБ) в сыворотке всего за 10 мин. В интегрированном чипе [17] происходит связывание белков-маркеров на поверхности сенсора и регистрируется электрический сигнал, что позволяет одновременно определять три сердечных биомаркера: тропонин Т, креатинкиназу ММ и креатинкиназу МВ. Встроенный чип позволяет достичь предела обнаружения 1 пг/мл для трех сердечных биомаркеров из 2 мкл крови за 45 мин.

Несмотря на быстрое развитие точных методов определения, разделение и концентрирование целевых аналитов остается актуальной задачей. Магнитные частицы (**МЧ**) используются в качестве твердофазных носителей для аффинной сепарации и концентрирования аналита. В настоящее время МЧ, функционализированные антителами, широко используются в аналитической химии как для разделения сложных смесей, так и для специфического определения различных соединений [18–21]. Применение МЧ позволяет преодолеть проблему диффузионных ограничений, типичную для гетерогенной иммунореакции. Комбинация МЧ с различными методами определения приводит к сокращению продолжительности анализа и снижению пределов обнаружения за счет уменьшения объема образца и концентрирования определяемого вещества в зоне измерения соответственно [22–24].

В настоящей работе представлена автоматическая биоаналитическая платформа (**АБП**) для проведения одновременного флуоресцентного опре-

деления методом иммуноанализа на магнитных частицах четырех кардиомаркеров в плазме крови пациентов с кардиопатологиями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ковалентная иммобилизация антител на магнитных частицах с помощью поверхностной функциональной аминогруппы ($-NH_2$). Поверхность МЧ функционализировали моноклональными антителами путем ковалентного связывания через глутаровый альдегид согласно протоколу производителя (Силекс, Россия). 1.75 мл смеси 0.025 М натрий-фосфатного буферного раствора, 22% глутаральдегида и 6 мг/мл МЧ в конечном объеме инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем МЧ промывали 0.025 М натрий-фосфатным буферным раствором (pH 7.4). После этого 1 мл раствора антител **Ат1** (анти-МГ клон 4E2cc, анти-СРБ клон C2cc, анти-Д-Дм клон DD189cc, анти-Цис-С клон Cyst24cc), содержащего аскорбиновую кислоту (5 мМ), добавляли в суспензию МЧ до конечной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали полученную смесь при постоянном перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Для пассивации свободной поверхностей магнитных частиц к суспензии добавляли 0.5% бычьего сывороточного альбумина (**БСА**) и инкубировали в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Несвязанные антитела и другие избыточные реагенты удаляли из суспензии многократной промывкой 0.05 мМ фосфатным буферным раствором (**ФСБ**) с pH 7.4. Затем МЧ ресуспендировали в 1 мл ФСБ с 0.1% БСА для получения стоковой суспензии 10 мг/мл. Для предотвращения бактериального загрязнения к готовой суспензии добавляли 20 мкл 1%-ного раствора азида натрия. Модификацию МЧ моноклональными антителами контролировали неконкурентным гетерогенным иммуноферментным анализом (**ИФА**) на магнитных частицах в качестве твердой фазы.

Синтез флуоресцентных конъюгатов. Антитела конъюгировали флуоресцентной меткой следующим образом: 200 мкл 0.1 мМ раствора антител **Ат2** (анти-МГ клоны 7C3cc, анти-СРБ C6cc, анти-Д-Дм DD255cc и анти-Цис-С Cyst19cc) в 50 мМ ФСБ с pH 7.4 смешивали с 0.5 мМ раствором сложного эфира N-гидроксисукцинимида бордипирометенового флуорофора BDP 558/568 (**Фл**) в диметилсульфоксиде и инкубировали в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при непрерывном перемешивании. Избыточные непрореагировавшие реагенты с низкой молекулярной массой удаляли диализом против ФСБ. Концентрацию антител в конъюгатах определяли спектрофотометрически с антивидовыми моноклональными антителами мыши, конъюгированными пероксидазой хрена, на микропланшетах, покрытых антигеном, при $\lambda = 450$ нм. Молярное отношение флуоресцентной метки к антителу в конъюгатах составляло 1.2–1.5.

Автоматизированная биоаналитическая платформа для одновременного определения биомаркеров. Автоматизированная биоаналитическая платформа для определения биомаркеров на МЧ методом иммуноанализа была изготовлена в лаборатории совместно с Троицким инженерным центром и позволяет одновременно определять антигены (**Аг**) МГ, Цис-С, СРБ и Д-Дм в плазме крови. Такая платформа состоит из чипа с реагентами, столика-манипулятора, микронасосов Cavro® XCalibur Pump (XC) (Tecan Trading AG, Швейцария) и системы детекции флуоресценции с длиной волны возбуждения 532 нм (зеленый твердотельный диодный лазер). Все действия манипулятора, насосов и детектора флуоресценции контролировались программой автоматического управления, разработанной авторами. Общая продолжительность процедуры, включая введение образца, смешивание, инкубацию, промывку и детектирование сигнала, составила 14 мин.

Автоматизированная биоаналитическая платформа (рис. 1) работает следующим образом. Чип с реагентами (*1*) устанавливается на платформу столика-манипулятора (*2*) и запускается компьютерная программа автоматического управления биоаналитической платформой. Для каждого аналита имеется отдельная лунка с МЧ, меченными специфическими антителами. Четыре отдельные лунки чипа подключены к промывочной насосной системе (*3*) для инкубации и промывки аналитов. Наконечник (*4*) разносит плазму крови в лунки для образцов. Объемы плазмы, необходимые для анализа, зависят от средней концентрации и молекулярной массы белка в плазме крови. Объемы образцов и флуоресцентного конъюгата представлены в табл. 1. Для проведения автоматического анализа аналиты разделены на две группы с высокой (СРБ и Цис-С) и низкой (МГ и Д-Дм) концентрацией в крови. Образец плазмы для определения МГ и Д-Дм разбавляют в два раза флуоресцентными конъюгатами, а в случае СРБ и Цис-С – в десять раз. Такая схема разбавления позволяет учесть разницу концентраций аналитов в два порядка. После добавления образца плазмы крови к МЧ и флуоресцентному конъюгату на поверхности МЧ формируется комплекс Ат1–Аг–Ат2-Фл. Не связавшиеся в комплекс реагенты удаляются с помощью промывки лунок раствором ФСБ, при этом МЧ удерживаются в лунке внешним магнитным полем от постоянного магнита (NdFeB).

Образцы плазмы крови были предоставлены городской клинической больницей № 51 и про-

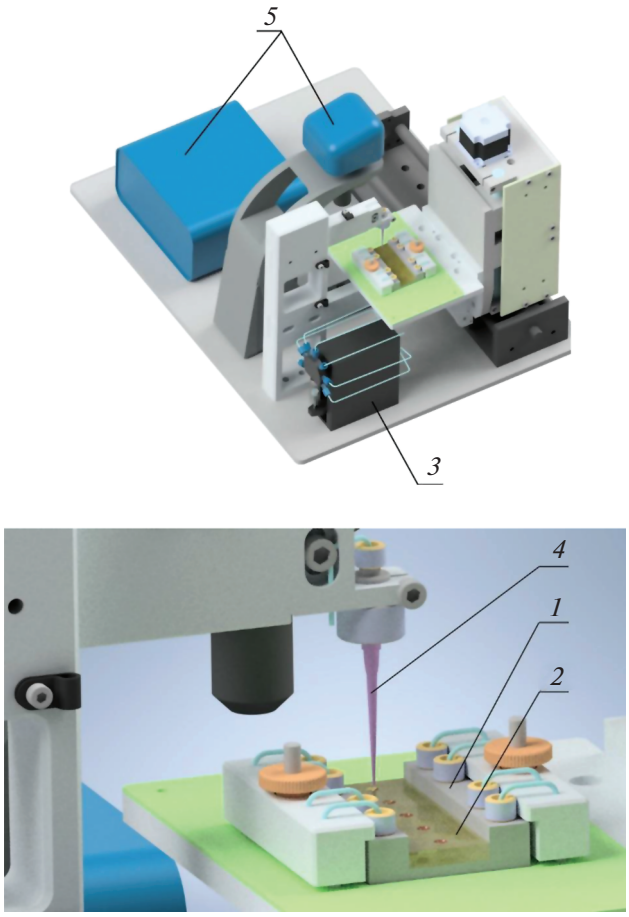

Рис. 1. Схема работы автоматизированной биоаналитической платформы для одновременного количественного анализа. *1* – чип с реагентами, *2* – платформа манипулятора, *3* – система промывочных насосов, *4* – наконечник, *5* – детектор флуоресценции.

анализированы в больнице на автоматическом анализаторе Siemens.

Флуоресцентные измерения с поверхности МЧ выполняли с использованием флуоресцентного анализатора (*5*) – спектрометра innoRam (BWTech) с лазером 532 нм (максимальная мощность 40 мВт), оснащенного видеомикроскопом BAC102. Объектив PL L 10/0.40 фокусирует лазерный луч в пятно шириной 210 мкм. Интенсивность излучения лазера оптимизировали для каждого аналита (см. табл. 1). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Рассчитывали среднее значение и доверительный интервал.

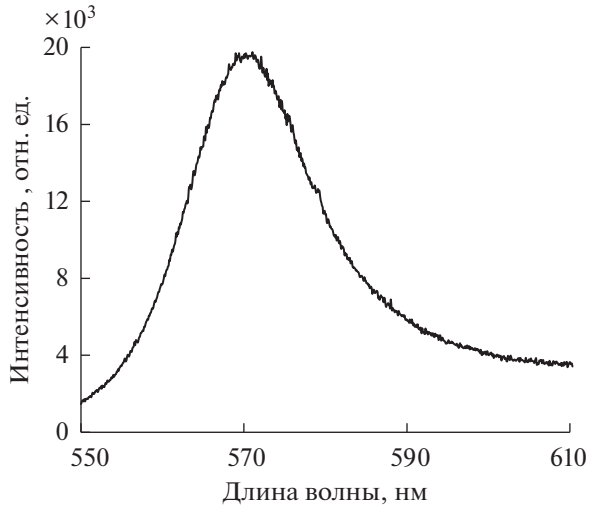

Рис. 2. Спектр флуоресценции красителя бордипирометенового флуорофора BDP 558/568.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биомаркеры определяли одностадийным методом иммуноанализа на МЧ с флуоресцентным детектированием. Спектр флуоресценции красителя BDP 558/568 представлен на рис. 2. В качестве аналитического сигнала в разработанной методике использовали максимальную интенсивность спектров флуоресценции. Принцип анализа и схема его проведения подробно описаны в работе [25].

Пределы обнаружения аналитов предлагаемым методом составляют: для МГ 5.7 нг/мл (0.32 нмоль/л), для Цис-С – 143 нг/мл (10.7 нмоль/л), для СРБ –

Таблица 1. Условия одновременного автоматического определения четырех аналитов

Условие	МГ	Цис-С	СРБ	Д-Дм
Объем образца плазмы, мкл	5	1	1	10
Объем флуоресцентного конъюгата, мкл	5	8	8	10
Концентрация флуоресцентного конъюгата, мкг/мл	10	8	8	10
Время инкубации, мин	5	5	3	10
Интенсивность лазерного излучения для физиологических концентраций, мВт	20	4	4	30
Интенсивность лазерного излучения для патологических концентраций, мВт	4	1.2	1.2	12

Таблица 2. Результаты (нг/мл) одновременного определения кардиомаркеров в плазме крови пациентов с кардиопатологией с использованием разработанной автоматической биоаналитической платформы и данные, полученные в больнице № 51

№ пробы	СРБ		Цис-С		МГ		Д-Дм	
	АБП	больница	АБП	больница	АБП	больница	АБП	больница
1	25000 ± 500	62060	1500 ± 100	1170	135 ± 10	141	500 ± 50	–
2	800 ± 100	730	1800 ± 100	1770	51 ± 7	58	500 ± 50	233
3	19300 ± 500	16010	2600 ± 100	2170	51 ± 7	53	3220 ± 100	3728
4	1450 ± 100	1380	1150 ± 50	–	47 ± 7	–	550 ± 50	586
5	13700 ± 500	14970	1600 ± 100	–	52 ± 7	–	10000 ± 500	23312
6	15000 ± 500	41500	1150 ± 50	1150	67 ± 7	64	2900 ± 100	2915
7	1780 ± 100	1790	790 ± 50	760	41 ± 7	42	200 ± 30	377
8	1600 ± 100	2030	950 ± 50	990	44 ± 7	41	1400 ± 100	1509
9	18000 ± 500	11170	1070 ± 50	960	44 ± 7	49	700 ± 50	621
10	25000 ± 500	45170	1600 ± 100	1350	74 ± 10	74	680 ± 50	582
11	16500 ± 500	16640	2300 ± 100	2111	88 ± 10	70	10000 ± 500	–
12	2000 ± 100	470	1320 ± 50	1320	42 ± 7	42	600 ± 50	–
13	12000 ± 500	8700	1700 ± 100	1650	44 ± 7	46	200 ± 30	206
14	3700 ± 300	3550	1100 ± 50	830	55 ± 7	30	600 ± 50	–
15	1700 ± 100	4700	1700 ± 100	–	40 ± 7	–	420 ± 50	566
16	6000 ± 300	4930	1030 ± 50	1020	60 ± 7	61	950 ± 50	956
17	25000 ± 500	64030	900 ± 50	700	54 ± 7	56	1300 ± 100	981

67 нг/мл (2.7 нмоль/л), для Д-Дм – 61 нг/мл (0.34 нмоль/л) [25].

Автоматизация может упростить мультиплексное обнаружение за счет сокращения затрат времени на рутинные процедуры, такие как промывка и перенос реагентов, а также за счет выполнения нескольких процессов одновременно.

Ранее одновременное определение четырех кардиомаркеров в плазме крови с помощью автоматизированной биоаналитической платформы проводили в плазме крови доноров с физиологическими концентрациями кардиомаркеров. В настоящей работе аналитические возможности платформы расширены и выполнено определение патологических концентраций аналитов. Расширение диапазона определяемых содержаний границ стало возможным за счет дополнительной регистрации флуоресцентного сигнала в условиях, отличных от условий регистрации сигнала от образцов с физиологическими параметрами (табл. 1). Такой подход позволяет получать количественные данные о концентрации белков за пределами их физиологических значений без проведения дополнительных операций по разведению образца, в отличие от анализа методом ИФА. Исследовали образцы крови пациентов с кардиопатологией. Результаты автоматизированного определения концентраций кардиомаркеров в образцах крови 17 пациентов с кардиопатологией представлены в табл. 2 в сравнении с показателями концентраций маркеров, предоставленных ГКБ № 51.

Из табл. 2 видно, что с учетом стандартной погрешности определения результаты, полученные с использованием разработанной биоаналитической платформы, соответствуют данным ГКБ № 51. Диапазон определяемых концентраций в плазме крови с помощью АБП для СРБ составляет 200–25000 нг/мл, для Цис-С 770–2600 нг/мл, для МГ 14–135 нг/мл, для Д-Дм 8–10000 нг/мл.

Разработанный способ флуоресцентного иммуноанализа с использованием магнитных микрочастиц позволяет проводить автоматизированное одновременное определение четырех кардиомаркеров в диапазоне как физиологических концентраций, так и за их пределами с использованием 17 мкл плазмы крови в течение 14 мин. Результаты автоматизированного экспресс-определения кардиомаркеров от 17 пациентов, выполненного на разработанной автоматической установке, коррелируют со значениями, полученными на автоматическом анализаторе Siemens в больнице № 51. Предлагаемый прототип может быть преобразован в стационарный прибор для экспресс-анализа крови и дифференциальной диагностики.

Работа выполнена за счет средств госзаданий АААА-А19-119071890024-8 и АААА-А19-119110790066-5 и гранта РФФИ 20-21-00080.

Авторы выражают благодарность больнице № 51 за предоставленные образцы плазмы крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Suzuki T., Lyon A., Saggar R., Heaney L.M., Aizawa K., Cittadini A., Mauro C., Citro R., Limongelli G., Ferrara F., Vriz O., Morley-Smith A., Calabrò P., Bossone E.* Editor's choice-biomarkers of acute cardiovascular and pulmonary diseases // Eur. Hear. J. Acute Cardiovasc. Care. 2016. V. 5. P. 416.
2. *Tripoliti E.E., Ioannidou P., Toumpaniaris P., Rammos A., Pacitto D., Lourme J.C., Goletsis Y., Naka K.K., Errachid A., Fotiadis D.I.I.* Point-of-care testing devices for heart failure analyzing blood and saliva samples // IEEE Rev. Biomed. Eng. 2020. V. 13. P. 17.
3. *Stone M.J., Waterman M.R., Harimoto D., Murray G., Willson N., Platt M.R., Blomqvist G., Willerson J.T.* Serum myoglobin level as diagnostic test in patients with acute myocardial infarction // Br. Heart J. 1977. V. 39. P. 375.
4. *Klocke F.J., Copley D.P., Krawczyk J.A., Reichlin M.* Rapid renal clearance of immunoreactive canine plasma myoglobin // Circulation. 1982. V. 65. P. 1522.
5. *Shlipak M.G., Katz R., Sarnak M.J., Fried L.F., Newman A.B., Stehman-Breen C., Seliger S.L., Kestenbaum B., Psaty B., Tracy R.P., Siscovick D.S.* Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease // Ann. Int. Med. 2006. V. 145. P. 237.
6. *Pepys M.B., Hirschfield G.M.* C-reactive protein: A critical update // J. Clin. Invest. 2003. V. 111. P. 1805.
7. *Simental-Mendía L.E., Sahebkar A., Rodríguez-Morán M., Zambrano-Galván G., Guerrero-Romero F.* Effect of magnesium supplementation on plasma C-reactive protein concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // Curr. Pharm. Des. 2017. V. 23. P. 4678.
8. *Ridker P.M., Cook N.* Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of framingham risk scores // Circulation. 2004. V. 109. P. 1955.
9. *Adam S.S., Key N.S., Greenberg C.S.* D-dimer antigen: current concepts and future prospects // Blood. 2009. V. 113. P. 2878.
10. *La'ulu S.L., Dominguez C.M., Roberts W.L.* Performance characteristics of the AxSYM D-dimer assay // Clin. Chim. Acta. 2008 V. 390. P. 148.
11. *Ibupoto Z.H., Mitrou N., Nikoleli G.P., Nikolelis D.P., Willander M., Psaroudakis N.* The development of highly sensitive and selective immunosensor based on antibody immobilized ZnO nanorods for the detection of D-dimer // Electroanalysis. 2014. V. 26. P. 292.
12. *Suprun E., Bulko T., Lisitsa A., Gnedenko O., Ivanov A., Shumyantseva V., Archakov A.* Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 25. P. 1694.
13. *Wang L., Xu M., Huang R., Chang X., Chen C., Li L., Zhang Z., Han Y.* A dual-label time-resolved fluorescence immunoassay for the simultaneous determination of cardiac troponin T and myoglobin // SLAS Technol. 2017. V. 22. P. 130.
14. *Koukouvinos G., Petrou P., Misiakos K., Drygiannakis D., Raptis I., Stefanitsis G., Martini S., Nikita D., Goustouridis D., Moser I., Jobst G., Kakabakos S.* Simultaneous determination of CRP and D-dimer in human blood plasma samples with white light reflectance spectroscopy // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 84. P. 89.
15. *Mitsakakis K., Gizeli E.* Detection of multiple cardiac markers with an integrated acoustic platform for cardiovascular risk assessment // Anal. Chim. Acta. 2011. V. 699. № 1. P. 1.
16. *Byzova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Y.Y., Starovoitova T.A., Dzantiev B.B.* A triple immunochromatographic test for simultaneous determination of cardiac troponin I, fatty acid binding protein, and C-reactive protein biomarkers // Microchim. Acta. 2017. V. 184. P. 463.
17. *Zhang G.J., Luo Z.H.H., Huang M.J., Ang J.J., Kang T.G., Ji H.* An integrated chip for rapid, sensitive, and multiplexed detection of cardiac biomarkers from fingerprick blood // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 28. P. 459.
18. *Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G.* Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406 P. 377.
19. *Lee E.A., Yim H., Heo J., Kim H., Jung G., Hwang N.S.* Application of magnetic nanoparticle for controlled tissue assembly and tissue engineering // Arch. Pharm. Res. 2014. V. 37. P. 120.
20. *Li C., Ma C., Wang F., Xi Z., Wang Z., Deng Y., He N.* Preparation and biomedical applications of core-shell silica/magnetic nanoparticle composites // J. Nanosci. Nanotechnol. 2012. V. 12. P. 2964.
21. *Colombo M., Carregal-Romero S., Casula M.F., Gutiérrez L., Morales M.P., Böhm I.B., Heverhagen J.T., Prosperi D., Parak W.J.* Biological applications of magnetic nanoparticles // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 4306.
22. *de Ávila B.E.F., Escamilla-Gómez V., Lanzone V., Campuzano S., Pedrero M., Compagnone D., Pingarrón J.M.* Multiplexed determination of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and C-reactive protein cardiac biomarkers in human serum at a disposable electrochemical magnetoimmunosensor // Electroanalysis. 2014. V. 26. P. 254.
23. *Yang Z., Wang H., Guo P., Ding Y., Lei C., Luo Y.* A multi-region magnetoimpedance-based bio-analytical system for ultrasensitive simultaneous determination of cardiac biomarkers myoglobin and C-reactive protein // Sensors (Switzerland). 2018. V. 18. P. 1765.
24. *Nechaeva N.L., Sorokina O.N., Konstantinova T.S., Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Byzova N.A., Bugrova A.E., Yanovich S.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N.* Simultaneous express immunoassay of multiple cardiac biomarkers with an automatic platform in human plasma // Talanta. 2021. V. 224. Article 121860.