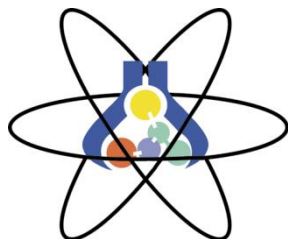


УНИВЕРЗИТЕТ „Св. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ – СКОПЈЕ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ХЕМИЈА



Павлинка Кокошкарова

**СКЕНИРАЧКА ЕЛЕКТРОХЕМИСКА
МИКРОСКОПИЈА (SECM)**

*семинарска работа по предметот
Современи биохемиски методи*

Скопје, 2021

СОДРЖИНА

SCANNING ELECTROCHEMICAL MICROSCOPY	3
ABSTRACT	3
<i>Keywords</i>	3
АПСТРАКТ	4
<i>Клучни зборови</i>	4
ВОВЕД	5
КРАТОК ОПИС НА ИНСТРУМЕНТАЦИЈАТА ШТО СЕ КОРИСТИ ВО SECM	12
ОБЈАСНУВАЊЕ НА ОСНОВНИТЕ ПРИНЦИПИ НА МЕХАНИЗМОТ НА ПОВРАТНА ИНФОРМАЦИЈА (ЕС') ВО ЦИКЛИЧНА ВОЛТАММЕТРИЈА ШТО НАЈЧЕСТО СЕ УПОТРЕБУВА ВО SECM	18
НЕКОИ ПОВАЖНИ АПЛИКАЦИИ НА SECM.....	22
ЗАКЛУЧОК	28
ЛИТЕРАТУРА	Error! Bookmark not defined.

SCANNING ELECTROCHEMICAL MICROSCOPY

ABSTRACT

Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) is an electrochemical-microscopic technique that is designed to get simultaneous insight into the local electrochemical activity and in topography of different redox systems. In this work, we present the basic principles of SECM, while we also shortly elaborate the instrumentation used in this technique. The basic principles of SECM that allow this technique to be applied in qualitative and quantitative analysis are also discussed. In this work, we also elaborate some of important applications of SECM for quantification of biomolecules in experiments with cells. We also discuss some of the problems met in this technique, mainly problems with pollution of working electrodes and problem with interferences. Alongside, we discuss application of SECM for quantification of important biomolecules, such as oxygen, hydrogen peroxide, glucose, DNA and RNA.

Keywords

Cell electrochemistry, voltammetry, feedback mechanism, electroanalytical chemistry.

АПСТРАКТ

Скенирачка електрохемиска микроскопија (од **анг. Scanning Electrochemical Microscopy, SECM**) е хибридна електрохемиско-микроскопска техника, дизајнирана со идеја да се добие истовремен увид за локалната електрохемиска активност и топографските карактеристики на различни редок системи. Во овој труд се претставени основните принципи на кои функционира оваа техника, а презентираан е и краток опис на инструментацијата што се употребува. Покрај тоа се дефинирани и теоретските принципи врз основа на кои е возможна апликација на техниката во квалитативна и квантитативна анализа. Во трудот се претставени и некои од карактеристиките на оваа техника за определување на важни биомолекули во експерименти со клеточни култури, а накратко се дискутирани и некои од проблемите што се среќаваат кај оваа техника, како што се проблеми со загадување на активната површина на работната електрода и проблеми со интерферентни супстанции. Покрај тоа е дискутирана и практичната примена на оваа техника за квантитативно определување на важни биомолекули како гликоза, DNA, RNA, кислород и водороден пероксид.

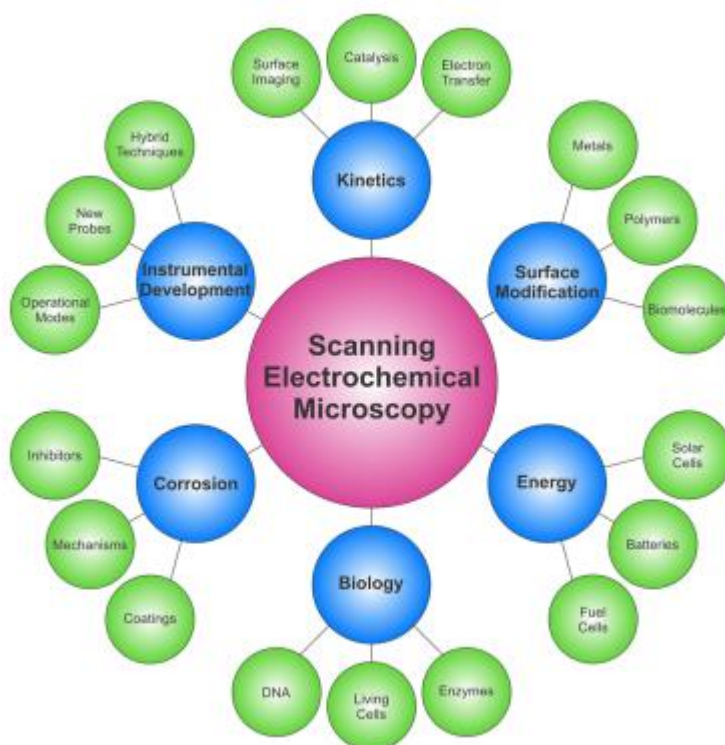
Клучни зборови

Електрохемија на клетки, волтамметрија, механизам на повратна информација, електроаналитичка хемија.

ВОВЕД

Скенирачка електрохемиска микроскопија (од **анг.** **Scanning Electrochemical Microscopy, SECM**) претставува микроскопска техника со помош на која може да се следи локалната електрохемиска активност на даден аналит што се наоѓа во даден електролитен раствор, при што истовремено се добиваат сознанија за содржината на аналитот, како и релевантни топографски карактеристики за примерокот што се анализира.

Техниката за прв пат е воведена 1989 година од страна на Bard и Engstrom и во последните дваесетина години наоѓа сè поголема примена во разни области на хемијата, физиологијата, медицината и науката за материјали [1-5]. Така, со помош на SECM може да се испитуваат процеси на корозија, процеси што се одвиваат на граница помеѓу две немешливи течности, трансфер на супстанции преку клеточни мембрани и сл. Со оваа техника може да се испитува и оксидо-редукцискиот статус на клетки, што може да се доведе во корелација со одредени патолошки состојби [2-5]. SECM покрај што се употребува како техника за добивање на топографски информации, се употребува и за квантитативно определување на голем број органски и неоргански молекули [1, 3, 5].



Слика 1. Апликации на SECM [3]

Дизајнирањето на ензимски биосензори, каде со употреба на оксидо-редукциски ензими се постигнува селективност во определувањето на дадени супстрати, е една од поголемите придобивки од употребата на SECM во аналитичката биохемија [2, 3]. Во голем број на експериментални системи, техниката овозможува и определување на кинетички параметри што се важни за испитуваните аналити (коефициент на дифузија, константа на трансфер низ гранична површина помеѓу две фази, константа на брзина на хемиска реакција и сл.) [5-8].

Во принцип, скенирачката електрохемиска микроскопија (SECM) вклучува употреба на мобилна електрода од мали размери т.н. ултрамикроэлектрода (UME), амперометриска или потенциометриска, што е неопходен елемент за детектирање на активноста и/или топографијата на дадена гранична површина, а се постигнува преку следење на инструменталниот одговор (измерената фарадеева струја).

Димензијата и природата на работните ултрамикроелектроди имаат клучна улога во функционирањето на оваа метода. Во SECM се користат ултрамикроелектроди со дијаметар од 25 μm , а во некои случаи и со помали димензии. Кога се користи UME, тогаш во нејзина непосредна близина се јавува хемисферична дифузија на електрохемиски активниот аналит, додека т.н. струја на стабилна состојба (i_{ss}) измерена на ултрамикроелектродата во најголемиот дел од електролитот е определена од дифузијата на редокс формите што трпат електрохемиска трансформација на UME.



Слика 2. Хемисферична дифузија на UME

<https://www.biologic.net/topics/secm101-an-introduction-to-scanning-electrochemical-microscopy/>

Измерената струја на стабилна состојба е дадена со следнава равенка:

$$i_{ss} = 4nFDCr$$

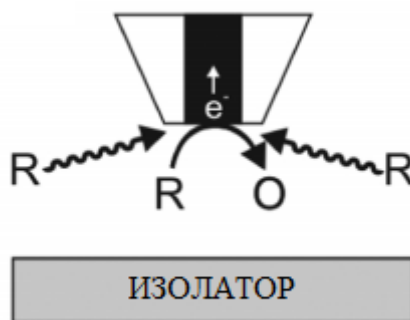
каде i_{ss} е струја на стабилната состојба, n е бројот на електрони што се разменуваат помеѓу електродата и анализот, F е Фарадеева константа, D е дифузионен коефициент, C е концентрација на анализот што се определува, а r е радиусот на УМЕ. Оваа равенка покажува дека измерената струја е директно поврзана со концентрацијата на анализот што се детектира [2, 3, 5].

Во SECM, со користење на низа оперативни режими (модови), може да се карактеризира широк спектар на експериментални системи и супстрати [3]. Важноста на оваа техника се темели на можноста за квантифицирање на флуksот на материјалот од површината на супстратот со висока просторна и временска резолуција. Покрај првичните, со тек на време се развиени и нови режими на работа, со цел да се прошири апликацијата на оваа техника во повеќе подрачја.

Најчеста форма што се применува кај оваа техника е режимот на повратна информација (од **анг.** feedback mode).

1. Негативен режим на повратна информација (од **анг.** negative feedback mode)

Доколку кон врвот од работната ултрамикроелектрода, на која може да се оксидира или редуцира даден редокс медијатор што е присутен во раствор, се приближува површина (на пр. клетка со нејзината мембрана) која не покажува електрохемиска активност, тогаш при доволно доближување на таа површина до работната ултрамикроелектрода доаѓа до спречување на дифузијата на електрохемиски активниот медијатор (слика 3).

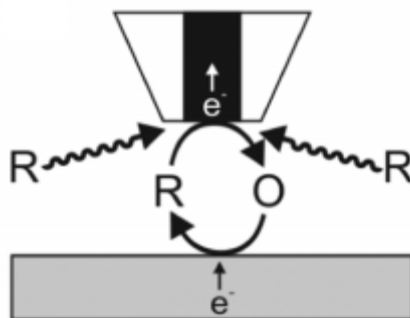


Слика 3. Негативен режим на повратна информација (negative feedback mode) [3]

На ваков начин, доаѓа до намалување на измерената струја што е резултат на електрохемиската активност на медијаторот. Со прецизно мерење на струјата како функција од растојанието помеѓу врвот на работната ултрамикроелектрода и електрохемиски неактивната површина, може да се направи мапирање (топографија) на примерокот (површината на клетката, на пример). Ваквиот механизам се нарекува негативен режим на повратна информација. При една ваква ситуација, постои помала ефективна концентрација на редокс медијаторот во дифузиониот слој на UME и затоа се мери пониска струја во споредба со струјата што е измерена во отсуство на тој изолационен материјал.

2. Позитивен режим на повратна информација (од **анг.** positive feedback mode)

Примената на овој оперативен режим во SECM се базира на употреба на електрохемиски активен редокс медијатор кој лесно може да разменува електрони (да се оксидира или редуцира) на површината од работната ултрамикроелектрода.



Слика 4. Позитивен режим на повратна информација (positive feedback mode) [3]

Притоа, генерираниот продукт при оваа електрохемиска реакција може да дифундира до површината на дадена проба за анализа (на пр. клетки). Доколку од пробата за анализа се генерира супстрат кој може преку хемиска реакција да го врати електрохемиски генерираниот продукт во првобитната оксидациска состојба, тогаш ќе дојде до регенерирање на почетната форма од редокс медијаторот. Овој процес ќе доведе до зголемување на измерената струја како резултат на оваа регенерација на почетната форма од редокс медијаторот.

Зголемувањето на струјата (најчесто се мери т.н. лимитирачка струја во волтаметриските техники) е пропорционално со концентрацијата на супстанцата што се генерира (испушта) од испитуваниот аналит. И со овој механизам, преку соодветно позиционирање на врвот од работната ултрамикроелектрода, е

возможно да се направи топографија на површината од која излегува анализот (на пр. клетките). Од покарактеристичните апликации на овој режим на повратна информација е утврдувањето на редокс состојбата на метастазирани човечки клетки кај пациентки што имале канцер на града.

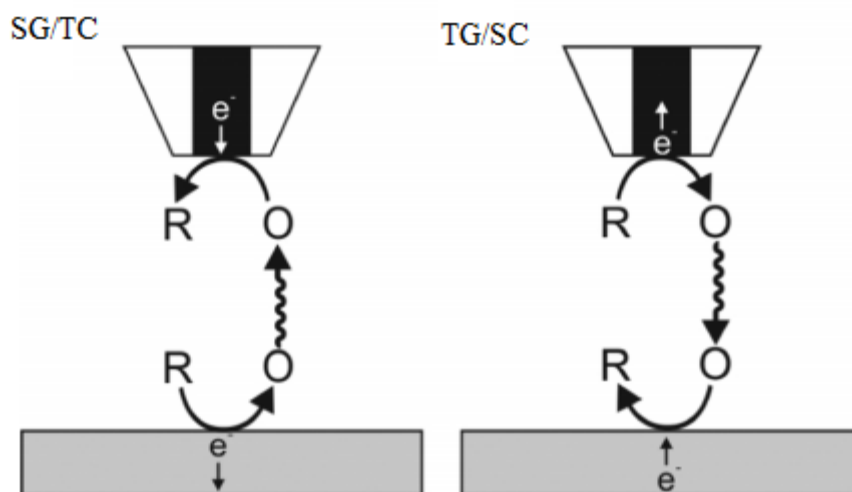
3. Режим на генерирање и колектирање (од **анг.** generation/collection mode, GC)

Овде разликуваме два типови на режими,

- substrate generation/tip collection (SG/TC)

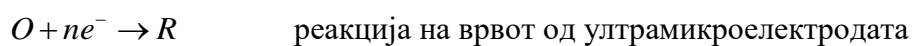
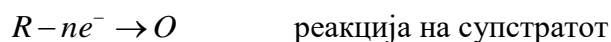
- tip generation/substrate collection (TG/SC)

со тоа што главната разлика потекнува од редокс реакцијата која се одвива или кај супстратот или на врвот од ултрамикроелектродата.



Слика 5. Режим на генерирање и колектирање (SG/TC и TG/SC) [3]

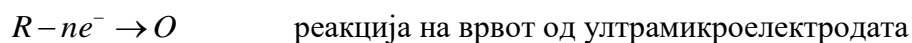
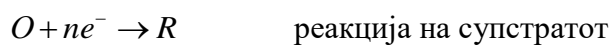
Кај **SG/TC** електроактивните видови се генерираат од супстратот, а се колектираат на врвот од ултрамикроелектродата според следниве реакции (под претпоставка дека е растворен само R):



Овие реакции претставуваат наједноставен приказ на овој режим. Самата продукција на „O“ го намалува „R“ кај супстратот, но, на врвот од ултрамикроелектродата со хемиска или електрохемиска реакција може да се генерира сосема нов продукт R. Овој мод се користи за мерење на концентрација или хемиски флукс од супстратот. Сепак овој режим има недостатоци од типот на

мала ефикасност на колектирање, мешање на реакциите од супстратот и врвот од UME, но, наоѓа примена кај корозијата и ензимските мерења.

Кај **TG/SC** електроактивните видови се генерираат од врвот на UME, а се колектираат од страна на супстратот според следниве реакции:



Се мери струјата и кај супстратот и на врвот од UME. Кога растојанието помеѓу врвот од UME и супстратот е мало, тогаш може да се постигне поголема ефикасност на колектирање. Овој мод главно се користи за мерење на кинетиката на реакциите или за модификација на супстратот.

4. Режим за директна детекција на аналит

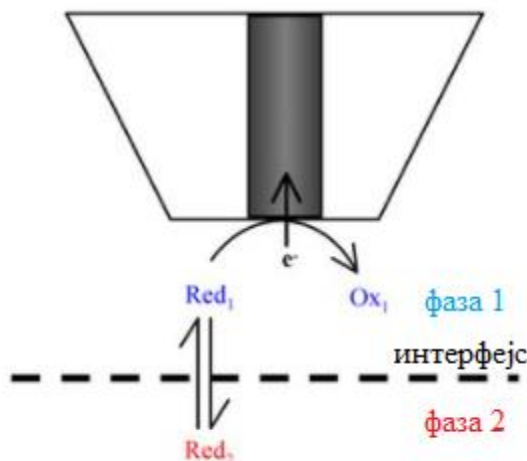
Доколку аналитот што се испитува може да покаже селективна електрохемиска активност (да разменува електрони со работната електрода), тогаш при употреба на соодветна ултрамикроелектрода, може да се определи концентрацијата на тој аналит преку мерење на интензитетот на струјата од неговиот електрохемиски одговор. Овој вид на директна детекција со SECM најчесто се применува за квантитативно определување на аналити што се хемиски инертни, односно аналити што не претрпуваат значајни хемиски промени во системот што се испитува. Покрај тоа, со имобилизација на дадени ензими на површината од работната електрода, со овој мод на директна SECM може да се испитува и активноста на некои липофилни ензими, како гликоза оксидаза (GOx), нитрат редуктаза (NR), алкална фосфатаза (AP) и сл. [3, 5].

Овој вид на SECM најчесто се употребува кога кинетиката на електрохемиската реакција е спора и тие аналити не можат да бидат детектирани со помош на редокс медијатори (преку т.н. режим на повратна информација).

Покрај тоа, со овој вид на SECM мерења, може да се мапираат и промените на концентрацискиот градиент на испитуваниот аналит во близина на испитуваните клетки.

5. SECM индуциран трансфер (SECMIT)-мапирање на пермеабилност

Процесите со индуцирана пермеабилност помеѓу две фази во кои постои заедничка редокс активна супстанца се еден од често употребуваните модови што се употребуваат во SECM [5].



Слика 6. SECM индуциран трансфер

https://www.researchgate.net/publication/6662543_Scanning_electrochemical_microscopy_Principles_and_applications_to_biophysical_systems/figures?lo=1

Доколку во фаза 1 имаме растворена одредена содржина на компонента Red_1 а истата компонента се наоѓа и во фаза 2 што е во контакт со фаза 1 (на пример, клетки дисперзирани во електролитен раствор што ја содржи супстанцата Red), тогаш при доволно време на електролиза, супстанцата Red_1 на даден потенцијал може целосно (електрохемиски) да се претвори во Ox_1 . Овој процес ќе индуцира премин на супстанцата Red_2 од фазата 2 во фазата 1. Притоа, тој индуциран трансфер на Red_2 од фаза 2 во фаза 1 ќе предизвика зголемување на струјата во електрохемискиот систем, споредено со ситуацијата во која нема трансфер на Red .

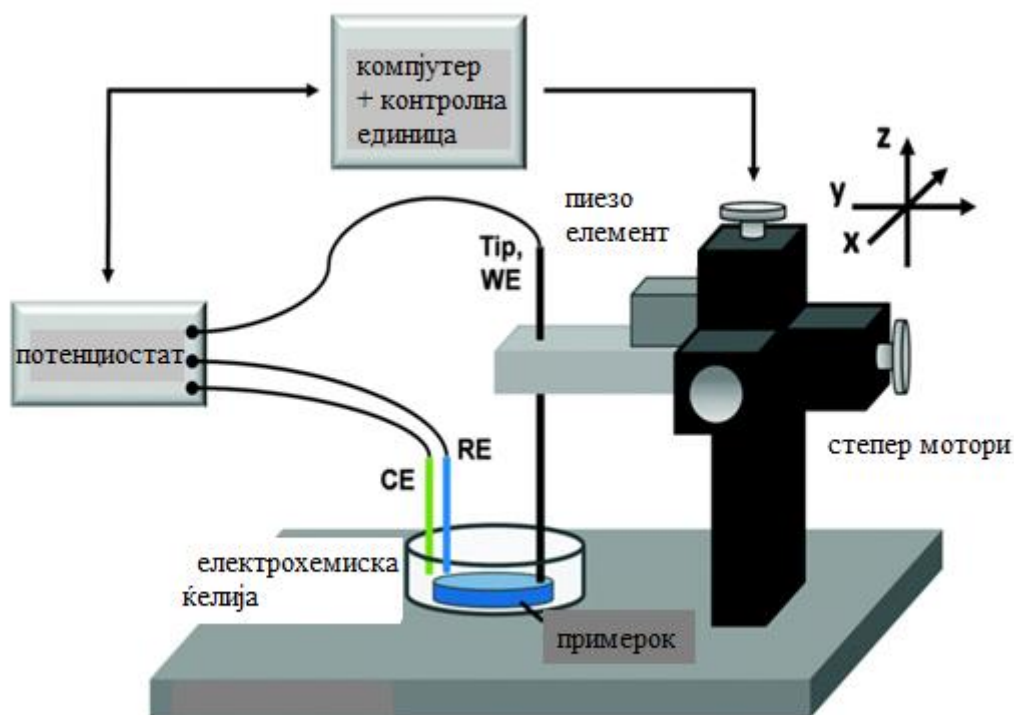
Зголемувањето на струјата кај ваквиот мод на SECM е пропорционално со дифузијата на Red во двете фази, како и со кинетиката на премин на Red помеѓу двете фази. Овој мод на SECM е погоден за испитување на пермеабилноста, брзината на дифузија и концентрацијата на таргетната молекула во дадена фаза. Со овој мод, на пример, е определен коефициентот на дифузија на кислородот во гркланот на свињи.

6. Режим за детектирање на проток (flow detection)

Групата на Unwin и соработниците [5] имаат покажано дека со помош на SECM, возможно е да се снимат и проток на флуид низ парчиња од цврст материјал (дентин). Притоа, авторите на трудот [5], покажале дека дифузивниот трансфер на флуид (што содржел редокс активен аналит) низ порите на парчиња од дентин овозможил да се направи топографија на дентинот. Тие податоци се од голема важност во денталната медицина, каде голем број на патолошки состојби во усната празнина се поврзани со движењето на флуиди низ порите на дентинот.

КРАТОК ОПИС НА ИНСТРУМЕНТАЦИЈАТА ШТО СЕ КОРИСТИ ВО SECM

Иако се достапни повеќе комерцијални инструменти, многу од нив се конструирани од индивидуални истражувачки групи прилагодени за специфични апликации.



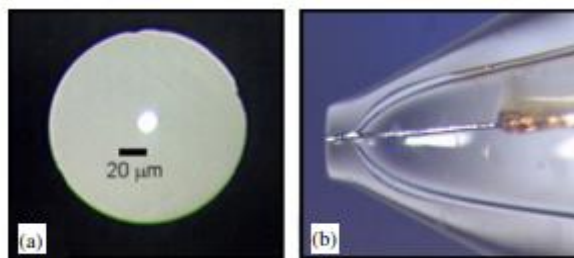
Слика 7. Шема на основните уреди (делови) вклучени во SECM

<https://alchetron.com/Scanning-electrochemical-microscopy>

Електрохемиската ќелија е сад во кој се изведуваат мерењата во SECM и истата може да биде едноставна чаша или Langmuir када поставена во

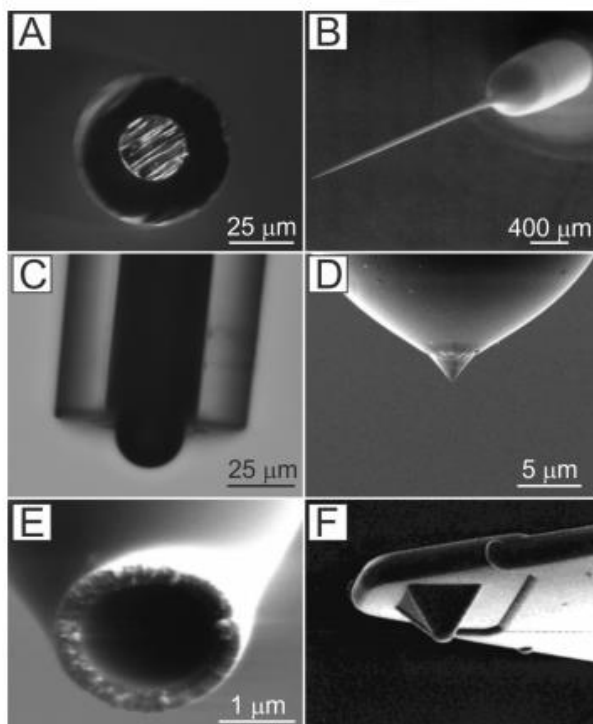
Павлинка Кокошкарлова Скенирачка електрохемиска микроскопија контролирана атмосфера [6]. Срцето на SECM е амперометриска или потенциометриска ултрамикроелектрода (работна електрода, WE) чие движење во однос на примерокот е контролирано преку соодветни пиезоелектрични позиционери. Во хадверскиот дел на техниката, еден од главните делови е и бипотенциостатот, што е еден вид на програмер за контрола на аплицираниот потенцијал, а други делови се засилувачите на струја и соодветниот компјутерски софтвер. Врвот од UME може да се движи нормално на површината на супстратот (z правец) или пак може да скенира при константно z преку површината, во x и y насока. Покрај работната електрода, во ќелијата има и референтна електрода (RE) и помошна (CE) (слика 7).

UME што се користи кај скенирачката електрохемиска микроскопија се состои од активен електроден материјал опкружен со изолациона обвивка со внимателно контролиран дијаметар. Врвот е полиран рамно, што резултира со активен регион во форма на рамен диск (flat disc electrode) [5].



Слика 8. а) нормална диск UME во трансверзална рамнина б) нормална диск UME (гледана од страна) [5]

Постојат различни геометриски форми на ултрамикроелектроди кои се користат во SECM, а некои од употребуваните форми се прикажани на слика 9. Како најчесто употребувани материјали од кои се изработени UME се платина (74%), јаглерод (10,8 %), златото (9,5 %), жива и сребро.



Слика 9. Различни геометриски форми на UME

(A) 25 μm Pt диск микроелектрода; (B) 200 nm Pt диск наноелектрода; (C) 25 μm Hg хемисферична микроелектрода; (D) Au конусна микроелектрода; (E) 0,7 μm Au прстенеста микроелектрода; (F) AFM-SECM врв на микроелектрода со 100 nm Au обвивка [3].

Резолуцијата на мерењето во SECM зависи од дијаметарот на активниот регион, чија димензија определува колку ултрамикроелектродата треба да биде близу до примерокот во текот на мерењето. Минимизирањето на електродите до ниво на наноелектрода е во тренд во последните години, бидејќи нуди многу придобивки, вклучувајќи ја и можноста за електрохемија на мали простори-капки, микроемулзии, везикули, единечни клетки, јадро и сл. Покрај ова, неопходен е и општо прифатлив софтвер кој може да се справи со голем број сетови на податоци и соодветни филтри за обработка на сликите.

Сепак и покрај ново развиените електроди, главно ограничување на SECM е релативно малата брзина на сликање, како и загадувањата на микроелектродите, посебно кога се работи со комплексен органски примерок. Покрај тоа, цената на инструментацијата е релативно висока (инструментот чини повеќе од 100 илјади евра), што ја прави оваа техника лимитирана, со можност за примена само во одредени истражувачки лаборатории.

Изведувањето на SECM експеримент бара внимателно разгледување на неколку важни фактори:

- избор на UME што треба да се користи;
- растворот во кој ќе се јави (случи) електрохемиската реакција;
- медијаторот и/или супстратот што се анализира.

Успехот на експериментот зависи од правилна комбинација на овие три параметри.

Електроди-терминот „ултрамикроелектрода“ се користи вообичаено во литературата и се дефинира како електрода со димензија помала од 25 μm . Тие се делат на амперометриски и потенциометриски. Секој вид има свои предности и недостатоци но, 99 % од експериментите се извршуваат со амперометриски ултрамикроелектроди.

Амперометриските ултрамикроелектроди се одликуваат со висока робустност (можат да се користат и по неколку години), брзи времиња на одговор (од наносекунди до мили секунди) и релативна леснотија во позиционирањето.

Но, ваквите ултрамикроелектроди имаат мала селективност и измерениот сигнал може да биде збир од повеќе фарадееви процеси. За разлика од нив, потенциометриските ултрамикроелектроди се одликуваат со висока селективност кон специфичен аналит но, имаат релативно бавно време на одговор, мал животен век и тешко се позиционираат.

Амперометриски ултрамикроелектроди-како што кажува и самото име, кај овие електроди снимениот сигнал е всушност струја произведена од фарадеевата реакција што се јавува на врвот на ултрамикроелектродата. Тие се состојат од електроактивно јадро опкружено со изолациона обвивка (на пр. стакло).

Нивната големина може да варира, а комерцијално доаѓаат во различни геометрии: конусна, прстенеста, хемисферична и прстенеста-диск форма. Најчесто користени се диск микроелектродите. Важна карактеристика секако е и односот на изолационата обвивка и електроактивното јадро (RG).

Потенциометриски ултрамикроелектроди-обично се користат при корозија, кинетички и биолошки мерења т.е. за локализирани мерења на pH.

Растворувачи-како и во сите електрохемиски експерименти, и во SECM е важен изборот на растворувач и основниот електролит, кои заедно образуваат еден систем. Спроводливоста на системот (отпорност на растворот) се темели на додавањето на вишок количини на електролит, како на пр. KCl. Улогата на овој поддржувачки електролит е особено важна, бидејќи поддржува проток на струја

помеѓу електродите, минимизирајќи го отпорот на растворот, при што ефикасно го елиминира придонесот на миграцијата за време на експериментот. Значителни промени во концентрацијата на електролитот можат да предизвикаат варијации во спроводливоста на растворот, а сето ова може често да резултира со погрешно толкување на податоците. Секако треба да се внимава и на комбинацијата на електролит и редокс медијатор.

Медијатор/и-е редокс електроактивна молекула/атом што може да биде оксидирана или редуцирана. Директниот редокс медијатор е дефиниран како молекула што е веќе присутна во растворот (на пример O_2), додека индиректен медијатор е молекула што се додава во растворот пред да започне експериментот.

Иако не постојат строги правила во однос на тоа кој медијатор треба да биде вклучен во специфичен режим на работа, сепак изборот во голема мера зависи од природата на примерокот кој се проучува. Медијаторот треба да биде хемиски стабилен во околината на растворувачот и инертен во однос на трите електроди во електрохемиската ќелија. Полнежот, хидро/липо-филноста, големината, коефициентот на пропустливост, стандардниот редокс потенцијал се исто така важни фактори кои можат да влијаат на SECM мерењата. Повеќето медијатори кои се користат во режимите на повратна информација се индиректни, т.е. се додаваат во растворот.

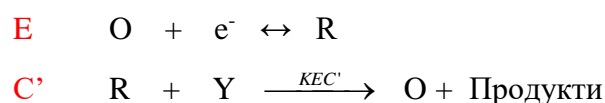
После напорите за минимизирање на ултрамикроелектродите што се користат во SECM на ниво на наноелектроди, последниве години се тежнее кон развој на комбинирани електроди, како оние што се користат во скенирачката микроскопија за спроводливост на јони (од **анг. Scanning Ion Conductance Microscopy, SICM-SECM**) и микроскопија на атомска сила (од **анг. Atomic Force Microscopy, AFM-SECM**).

Табела 1. Комбинирање на SECM со други техники (предности/недостатоци)

Техники	Принципи	Супстрати	Предности	Недостатоци
AFM-SECM	Преку интерактивните сили помеѓу UME и супстратот се добива информација за топографијата и симултано преку детектирањето на фарадеевата струја (или потенцијалот) се мапира електрохемиската активност на површината на супстратот.	Спроводливи, неспроводливи, меки, крвкни и тврди примероци	1. Прецизно контролирано позиционирање на врвот на UME 2. Резолуција на наноскала за топографско и електрохемиско детерминирање.	1. Висока цена на експеримент 2. Ограничена сигурност и издржливост на UME 3. Потребно е целиот примерок да биде потопен во електролитен раствор, кој може да ја компромитира стабилноста на врвот на UME и примероците.
SICM-SECM	Се мери струјата на јонска миграција помеѓу две квази-референтни бројачки електроди за да се утврди висински профил (топографија) и фарадеева струја (или потенцијал) Одговорот на електродата е симултано детектиран за да се утврди електрохемиската активност.	Тврди или меки, неспроводливи примероци	1. Точно позиционирање на врвот на UME 2. Топографска/електрохемиска висока резолуција на слики 3. Нема контакт со примероците, неинвазивна метода и може да биде предност за набљудување живи ткива и клетки како и биолошки примероци.	1. Недостаток на добавувачи на комерцијални UME 2. Инструментацијата за позиционирање во SICM-SECM е релативно специјализирана. 3. Иако има висока резолуција на слика, сепак не е конкурентна во однос на AFM-SECM. 4. Теоријата на SICM-SECM моментално е несоодветна.

ОБЈАСНУВАЊЕ НА ОСНОВНИТЕ ПРИНЦИПИ НА МЕХАНИЗМОТ НА ПОВРАТНА ИНФОРМАЦИЈА (ЕС') ВО ЦИКЛИЧНА ВОЛТАМЕТРИЈА ШТО НАЈЧЕСТО СЕ УПОТРЕБУВА ВО SECM

Овој електрохемиски систем е еден од релевантните механизми во волтаметријата што се користи како модел за студирање на голем број аналити во SECM, во присуство на редокс медијатор. Притоа, електрохемиски приказ на овој механизам е даден на шемата број 1:

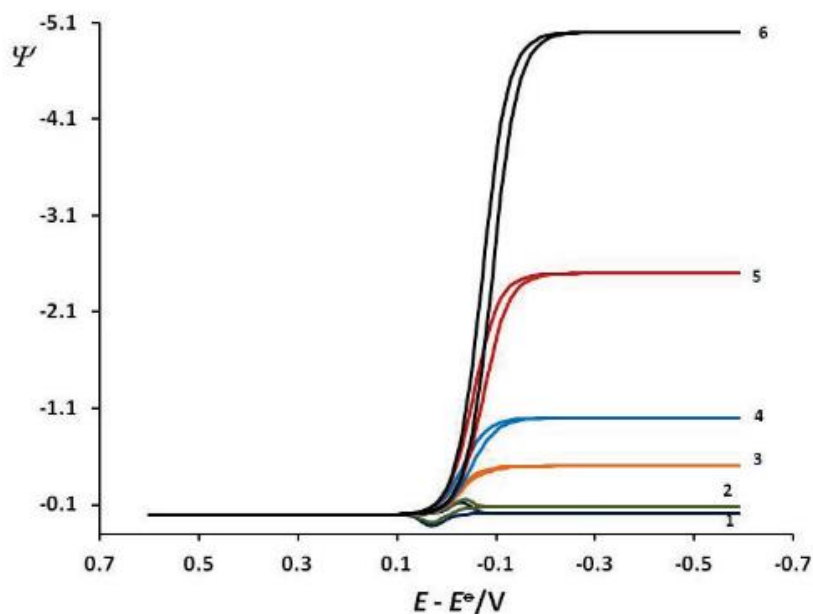


Шема 1. Механизам на повратна информација за студирање на аналитот „Y“ во присуство на редокс медијаторски пар „O-R“

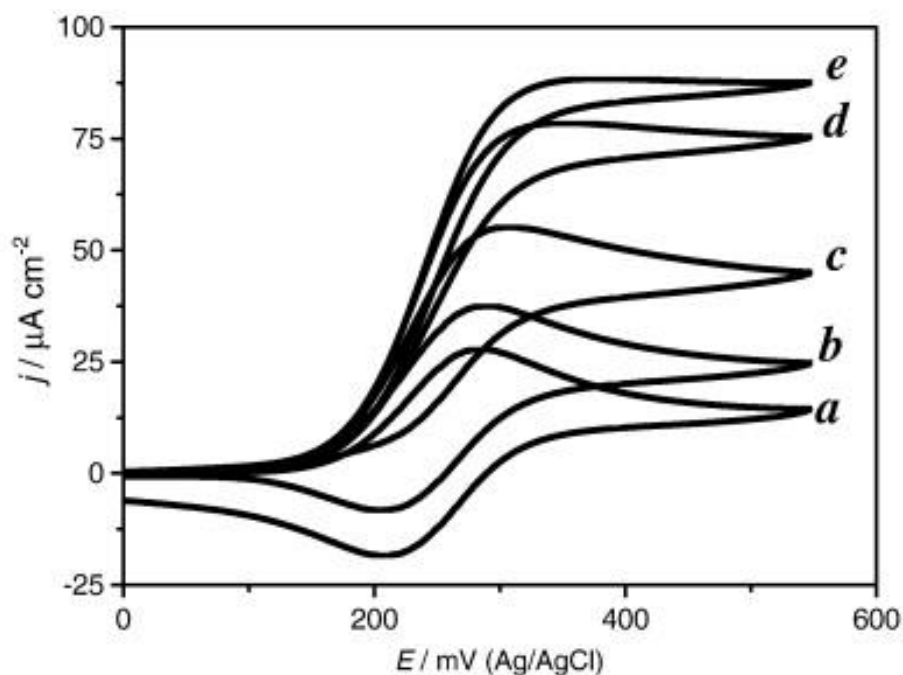
Терминологијата за овој механизам претставен со шемата погоре е следната:

„O“ е „електрохемиски“ активна супстанца (најчесто калиум хексацијаноферат III) што може да се редуцира до продукт „R“ (во случајот калиум хексацијаноферат II) на работната електрода. Со „Y“ е означен супстрат, односно супстанцата што треба да ја анализираме во даден примерок (клетка). Супстратот „Y“ има својство да реагира со продуктот на електрохемиската реакција „R“ и при таа хемиска реакција повторно да се регенерира почетниот аналит „O“ [9-14].

Супстратот „Y“ треба да е електрохемиски неактивен (во подрачјето каде што се случува електрохемиската активност на аналитот „O“) и да е (најчесто) присутен во поголема концентрација од „O“. Зголемувањето на концентрацијата на аналитот „Y“ доведува до промени во цикличните волтамограми, што се отсликуваат преку промените на струјата и потенцијалот на цикличните волтамограми, како што е прикажано на слика 10.



Слика 10. Приказ на теоретски циклични волтаммограми што се резултат на т.н. механизам на повратна информација на редокс медијаторот „O-R“ и аналитот „Y“ [10]



Слика 11. Циклични волтаммограми на гликоза оксидаза добиени во присуство на гликоза во концентрации а) 0,0 mM/L; б) 1,6 mM/L; в) 3,2 mM/L; д) 9,9 mM/L; е) 22,7 mM/L при брзина на скенирање од 5 mV/s. Графитна микроелектрода со дијаметар од 1 μm е користена како работна електрода, а експериментите се изведувани во 0,1 mol/L пуфер од $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Extracting kinetic parameters for homogeneous $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$ mediated enzyme reactions from cyclic voltammetry and simulations - ScienceDirect

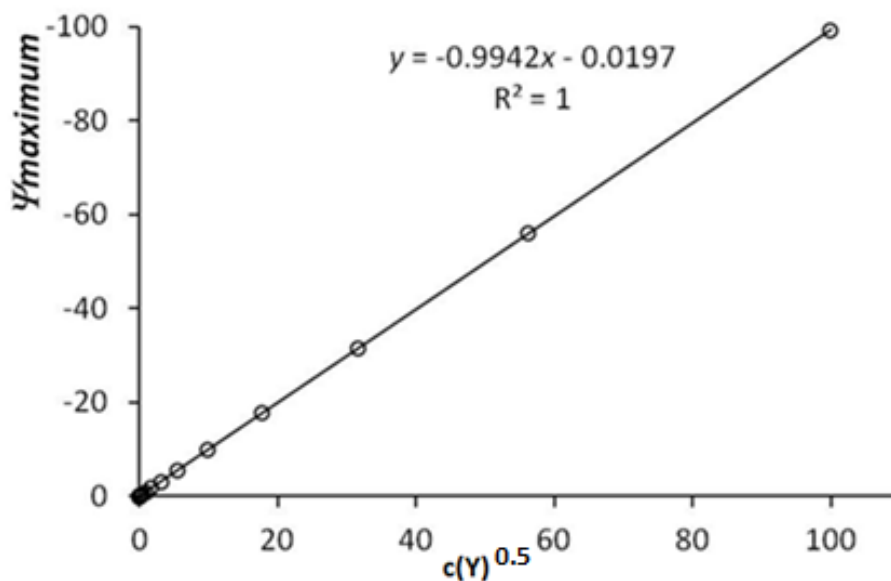
Од струјата на цикличните волтаммограми може да се определи квантитативно аналитот „Y” и силата на интеракции (кинетиката на хемиските интеракции) помеѓу аналитот „Y” и формата „R” од редокс медијаторот [12, 14].

Преку промените на концентрацијата на аналитот „Y”, промените што се јавуваат во цикличните волтаммограми се преставени на волтаммограмот на слика 9. Притоа, добиениот пик означен со бр.1 на слика 10 е само од редокс медијаторот „O-R”, снимен без присуство на аналитот „Y”, додека останатите циклични волтаммограми на слика 10 со броеви од 2-6 се снимени во присуство на аналитот „Y” со концентрации од 1, 5, 10, 20 и 50 mmol/L, соодветно. На овие волтаммограми се гледа ефектот на аналитот „Y”, чие зголемување во концентрацијата доведува до промена во формата на пиковите што се јавуваат со постепено зголемување на концентрацијата на аналитот „Y”.

Кај волтаммограмите прикажани на слика 10, карактеристичен параметар за механизмот на повратна информација е т.н. „steady state” состојбата на волтаммограмите. Вака се нарекува крајната десна струја на цикличните волтаммограми на слика 10 (платото), што се добиени од редокс медијаторот „O-R” во присуство на аналитот „Y”, кога „Y” е присутен во концентрации што се повисоки за еден ред на величина од концентрацијата на редокс медијаторот. Тие делови ги претставуваат т.н. „гранични струи” на цикличните волтаммограми и во тој дел на волтаммограмите, струјата зависи само од концентрацијата на аналитот „Y” [2, 5, 10-12].

Формата на претставените волтаммограми на слика 10 е во вид на т.н. „сигмоидални криви”, чија лимитирачка струја на десното плато може да се анализира како функција од концентрацијата на аналитот „Y”. Овие сигмоидални криви карактеристични за оваа „steady state” состојба се добиваат кога брзината на хемиската реакција помеѓу аналитот „Y” и електрохемискиот продукт од редокс медијаторот (формата „R”) е многу поголема отколку брзината на електрохемиска трансформација на продуктот „R” во почетниот реактант (формата „O” од редокс медијаторот). Со графичко претставување на овие струи (ψ_{maximum}) како функција од квадратен корен од моларната концентрација на аналитот „Y” се добива график (слика 12) од кој може квантитативно да се определи концентрацијата на аналитот „Y”, како и константата на брзината на механизмот на повратна информација (означена со K_{EC} на шемата 1), што дава информации за брзината на хемиската реакција помеѓу аналитот „Y” и формата „R” од редокс медијаторот [2, 10-12].

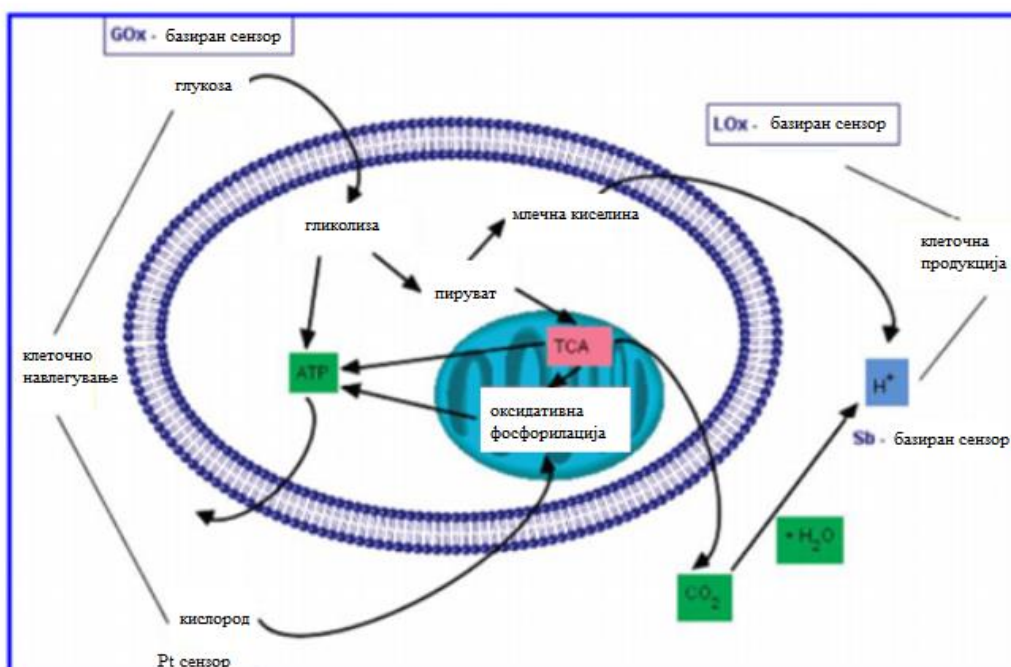
Експериментални волтаммограми добиени со помош на SECM, каде е прикажан процесот на електрохемиска трансформација на ензимот гликоза оксидаза во присуство на различни концентрации на гликоза се прикажани на слика 11. Од граничните струи на цикличните волтаммограми може да се определи концентрацијата на гликоза, како и брзината на ензимската реакција на гликоза оксидаза и гликоза при дадените експериментални услови.



Слика 12. Приказ на граничните теоретски струи (Ψ_{maximum}) како функција од квадратен корен од концентрацијата на анализот „Y“ механизам на повратна информација [10].

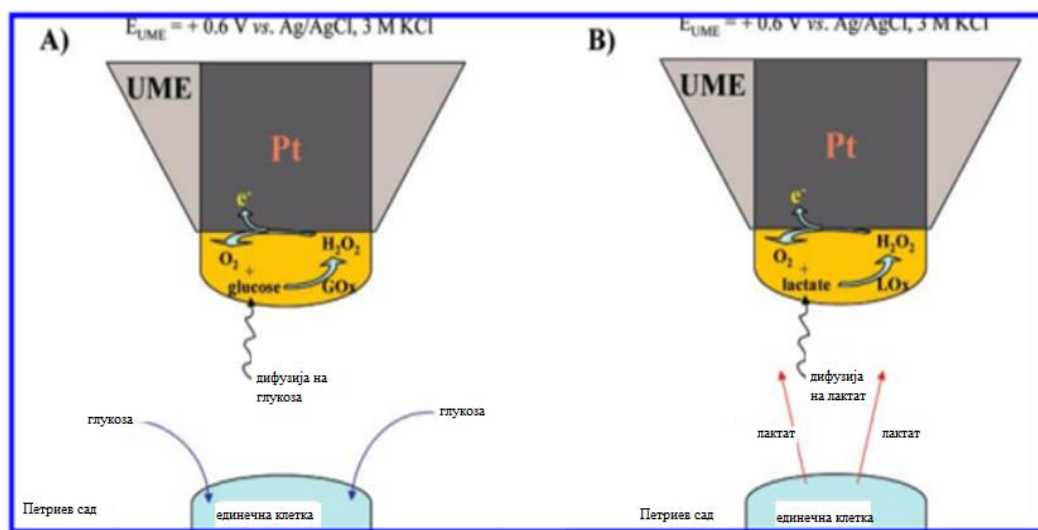
НЕКОИ ПОВАЖНИ АПЛИКАЦИИ НА SECM

Во овој дел од семинарската работа, опишани се некои карактеристични апликации на SECM, што се однесуваат главно за детекција на физиолошки важни супстанции во експерименти со единечни клетки. Во еден од поинтересните трудови, Ciobanu и соработниците [15] во SECM студија користеле Pt UME, на чија површина ги имобилизирале ензимите гликоза оксидаза (GOx) и лактат оксидаза (LOx). Познато е дека сензорите базирани на ензими се важни во биоелектрохемиските апликации, бидејќи тие нудат селективност кон одреден аналит. Познато е дека ензимите поседуваат молекуларно препознавање на супстрати (аналити од интерес) засновани на структурна комплементарност. Во трудот [15], следена е осетливоста на вака модифицираните UME кон супстратите гликоза и лактат, соодветно. Биосензорот со имобилизирана GOx е користен во експерименти при детекција на гликоза кај поединечни фибробласти, додека биосензорот со LOx за детекција на производениот лактат од единечни канцерогени клетки [15]. Притоа, авторите утврдиле дека единечните канцерогени клетки се повеќе набрани, а забележана е и поголема респираторна активност во делот каде клетката го допира петриевиот сад.



Слика 13. Променет метаболизам на канцерогените клетки во однос на нормалните, гликолизата е еден од погодените патишта [15]

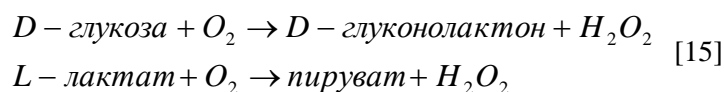
На UME на која е имобилизирана GOx и LOx, се детектираат гликоза и лактат индиректно на површината на електродата со амперометриска оксидација на водороден пероксид.



Слика 14. UME биосензор базиран на ензими.

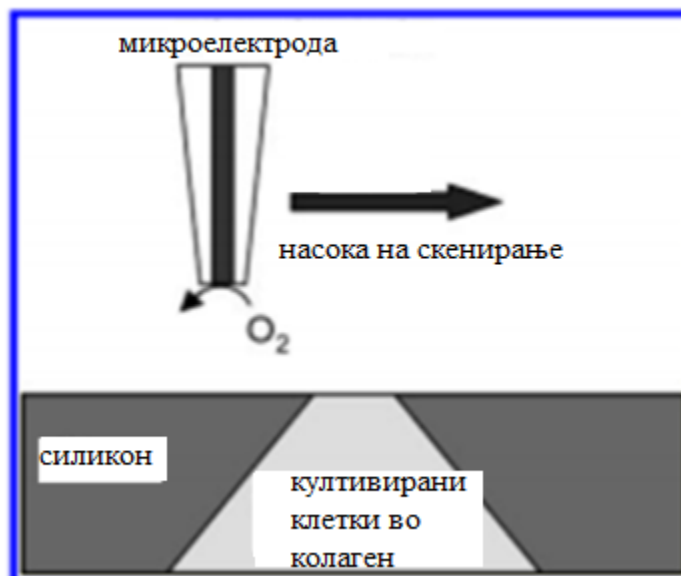
Ензимски слој GOx (A) или LOx (B) електрополимеризиран или излеан на 25 μm Pt UME.

[15]



SECM е корисна техника за студирање на метаболички флуks на клетки, бидејќи техниката може да ја мапира електрохемиската активност низ целата површина на една клетка и може да детектира динамички промени. SECM со текот на годините се користи за студирање на биолошки системи, но од неодамна големо внимание е посветено на клеточни студии со помош на оваа техника. Така, Matsue и соработниците [16] ја следеле респираторната клеточна активност на клетки култивирани во колаген (кој ја поддржува клеточната пролиферација и индукцијата на клеточна диференцијација) со помош на SECM, со цел да се студира чувствителноста на лекот против канцер [16].

Авторите експериментирале со два вида на клетки: клеточна линија K562 кај еритролеукемија и нивна подлинија K562/ADM што се резистентни на адријамицин (ADM). Капки на колаген што содржат клетки (или еден вид вонклеточна матрица слична на *in vivo*) биле имобилизирани во пирамидални микро отвори на силиконска подлога, каде била следена нивната чувствителност на ADM.

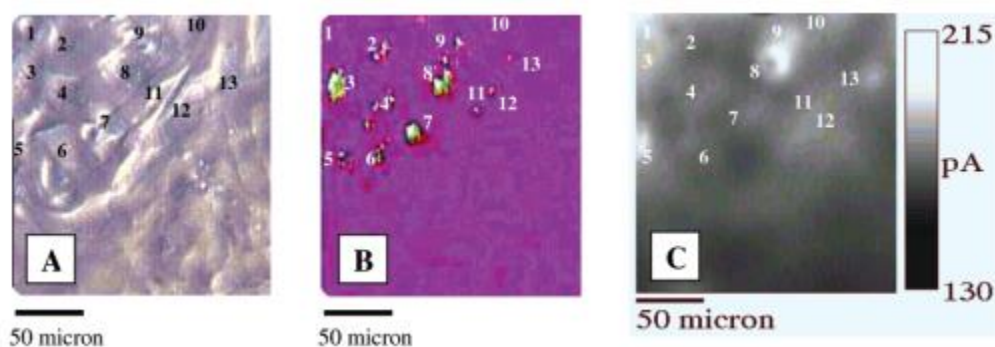


Слика 15. SECM на култивирани клетки во капка колаген имобилизирани во силиконски супстрат [16]

Со помош на SECM е возможно неинвазивно мерење на активноста на дишење, како и мониторирање на одговорот на соодветна доза од лекот. Ова е возможно благодарение и на употребата на флуоресцентна боја.

Mirkin и соработниците [17] со помош на SECM истражувале различни типови на хумани клетки од дојка во еднослојна култура. Целта на овие експерименти била можноста да демонстрираат разлики на нетрансформирани хумани епителни клетки на дојка (MCF-10A) и метастатски клетки на дојка (MDA-MB-231) како резултат на нивните редокс активности. Авторите во трудот [17] идентификувале серија на хидрофобни редокс медијатори што можат да ја преминаат клеточната мембрана. Во трудот [17] е испитувана нивната дистрибуција помеѓу цитосолот и јадрото, при што авторите заклучиле дека истите не можат да навлезат во нуклеусот. Притоа, користен е едноставен модел за да се анализира кинетиката и да се идентификува лимитирачкиот чекор на реакцијата на регенерација на повеќестепениот медијатор. Природата и концентрацијата на редокс медијаторот можат да бидат причина за вкупниот пренос на полнеж или мембрански транспорт (разликата помеѓу интрацелуларниот редокс потенцијал и формалниот потенцијал на медијаторот) [17]. Авторите развиле два различни методи за проценка на интрацелуларната концентрација на редокс центри способни да реагираат со специфичен редокс медијатор. Разликите помеѓу нетрансформирани хумани клетки на дојка и метастатски канцерогени клетки на дојка произлегуваат од различните

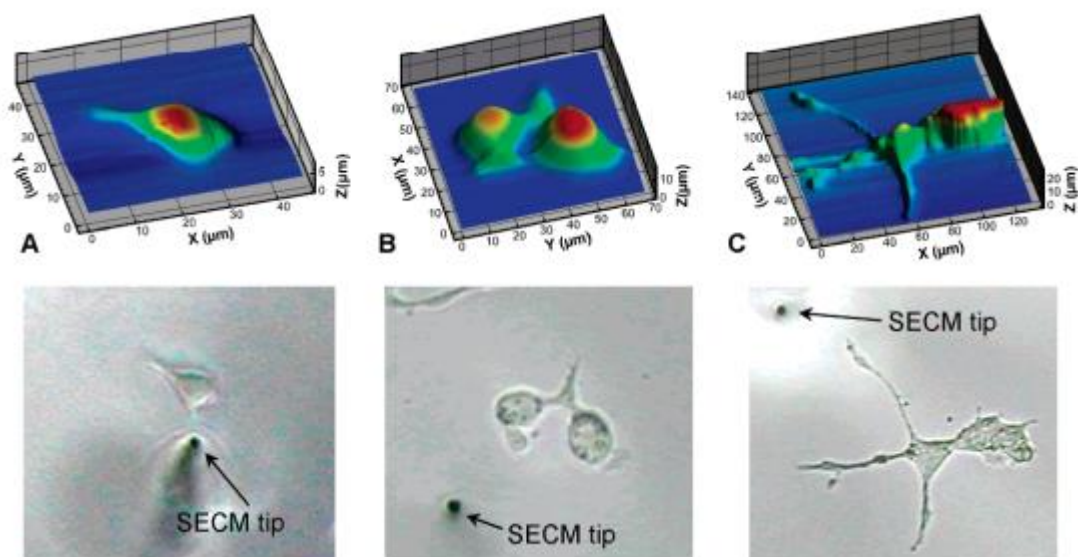
концентрации на редокс активни делови во тие клетки. Овие експерименти се разликувале од останатите, затоа што истражувањата се вршеле кај еднослојна култура на клетки, а не на поединечни клетки. Авторите [18] утврдиле дека повеќе фактори како: растојанието помеѓу електродата и клетката, густината на клетките, изборот на медијатор и неговата концентрација, можат да се искористат за да се зголеми контрастот кај сликите кои се добиени со SECM и да се утврди разликата помеѓу метастатски и нетрансформирани хумани клетки од дојка.



Слика 16. Слики добиени со А) оптичка, В) флуоресцентна микроскопија и С) SECM [18]

Kurulugama и соработниците [19] истражувале недиференцирани и диференцирани PC 12 клетки користејќи режим на константна оддалеченост на микроелектродата во SECM, при што добиле слики на модели на неврони со висока резолуција. Во трудот [19], авторите употребиле два вида на сигнали за повратни информации: струја како резултат на електролиза на егзоген медијатор и импеданса мерена со врвот на електродата директно во медиумот за раст на клетките (без редокс медијатор). Највисока резолуција е добиена со употреба на електрода на чиј врв имало 1 μm јаглероден прстен со режим на постојана струја.

Сепак, режимот на постојана импеданса генерирал подобри резултати, затоа што топографијата и фарадеевата струја можеле да се измерат истовремено и не бил потребен медијатор. Сепак, со движењето на врвот на микроелектродата преку клетката при режимот на константна оддалеченост, клеточната морфологија и везикуларното ослободување можеле истовремено да се детектираат. Во ваков случај, авторите покажале дека SECM е моќна алатка за истражување на просторната распределба на ослободувањето на невротрансмитерот *in vitro*.



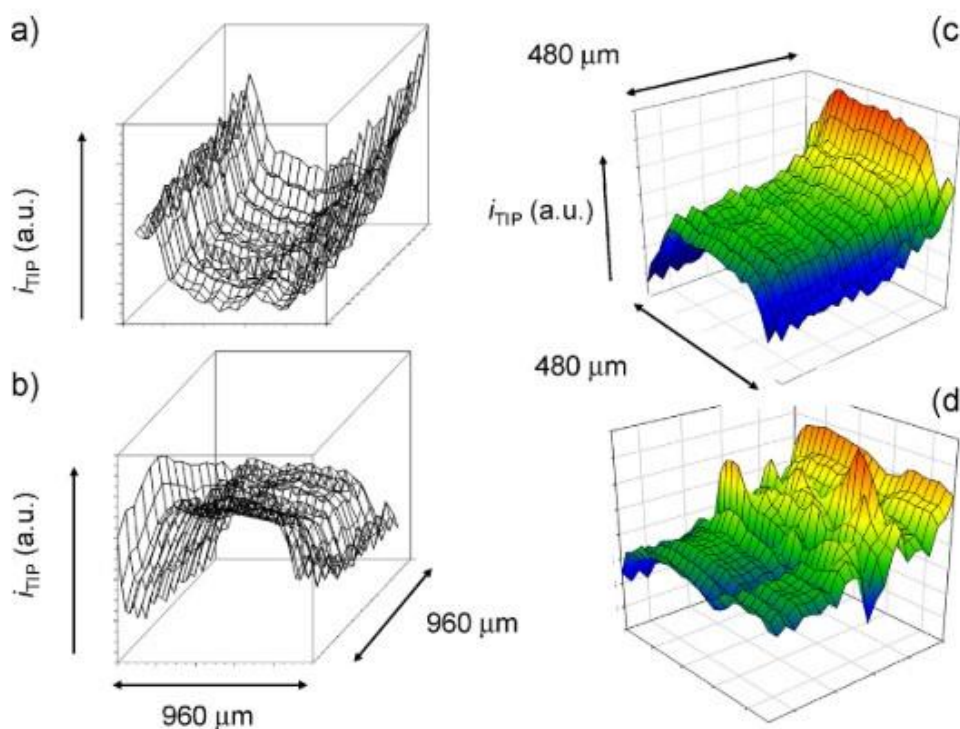
Слика 17. Топографски слики добиени со SECM со употреба на режим на константна оддалеченост на микроелектрода со јаглероден прстен со дијаметар од $1\ \mu\text{m}$ [19]

Vard и Mauzeroll [20] со помош на SECM ја следеле транспортната активност на клетките од квасец при навлегување на менадион (2-метил-1,4-нафтохинон) кој бил токсичен за нив како и екскрецијата на комплексот кој го гради со глутатион. Авторите ја следеле струјата на врвот на UME на клетки од квасец суспендирани во раствор што содржел менадион. Од експортот на конјугатот менадион-глутатион што бил детектиран со UME со дијаметар од $1\ \mu\text{m}$ на растојание од $10\ \mu\text{m}$ од клетките, бил утврден флукс од околу 30 000 тиодион молекули во секунда по клетка [20]. Оваа студија всушност се засновала на директно електрохемиско детектирање на тиодион и се разликувала од останатите во кои бил вклучен даден редокс медијатор. Инаку самиот глутатион е најголемо непротеинско сулфхидрилно соединение што е присутно во клетките и има заштитна улога со помош на неговите антиоксидативни својства, како резултат на конјугацијата со штетни соединенија или хелација со тешки метали.

SECM е електрохемиска алатка за следење и мерење на DNA и RNA а може да послужи за да се испита однесувањето на едноверижна-ss DNA (single stranded DNA) како и двоверижна-ds DNA (double stranded DNA) [21, 22].

Domènech-Carbó и соработниците [23] со помош на SECM успеале да направат разлика меѓу ss DNA и ds DNA со употреба на кантин-6-он и фероцен како редокс медијатори. Утврдиле дека струјата на врвот од микроелектродата на краевите на ss DNA влакната била поголема отколку во централниот дел, што

укажува на помала ефикасност на фероценот во централниот дел на ss DNA влакната. Но, со примена на релативно понизок потенцијал струјата на реоксидација на кантин-6-он била повисока во централниот дел на ss DNA Ова може да биде индиректен доказ на силен афинитет на кантин-6-он со ss DNA [23].



Слика 18. SECM фотографии од а-с) ss DNA d) ds DNA влакна имобилизирани на Pt електрода [23]

Кога на подлогата биле имобилизирани ss DNA и ds DNA влакна забележале врз основа на измерената струја дека кантин-6-он посилно се врзува со ds DNA отколку со ss DNA. Со помош на овие испитувања се овозможува напредок во дизајнирањето на лекови и дијагноза на генетски заболувања.

ЗАКЛУЧОК

SECM е релативно нова електрохемиско-микроскопска техника што има голем број на апликации кои не можат да бидат изведени со класичните електрохемиски техники. Со користење на SECM може локално да се открие електрохемиска активност на даден примерок. Генерално, во електрохемијата мерењето е просек за целиот примерок, а тоа значи дека локалните карактеристики и процеси кои можат да имаат голем ефект во мерењето, не можат да се разликуваат од другите карактеристики на примерокот што се анализира. Со користење на SECM е можно да се визуелизираат овие ефекти. Пример е употребата на SECM за мерење на електрохемиските карактеристики на нови материјали и биолошки примероци. Овие системи обично покажуваат различни ефекти врз важните електрохемиски карактеристики на системот (струјата, полуширината на волтаметрискиот пик, потенцијалот на волтаметрискиот пик) кои поединечно не би можеле лесно да ги разликуваме.

SECM е техника што може да се изведува со употреба на ултрамикроелектрода која се наоѓа на поинакво растојание од објектот отколку кај другите техники за локално мерење како што е Atomic Force Microscopy. Треба да се нагласи дека и AFM припаѓа на семејството микроскопи со скенирачка електрода и работата се заснова на мерењето на меѓумолекулските сили помеѓу атомите на мерната електрода и атомите на испитуваниот примерок, Сепак, SECM е посебно погодна техника доколку се мерат кривки примероци кои можат да се оштетат многу лесно преку контакт. Притоа, со SECM добиваме информации не само за електрохемиската активност, туку и за топографијата. Со AFM не може да се испитуваат клетки, а врвот на електродата создава електричен контакт со атомските орбитали. Со AFM можат да се следат структурните карактеристики на цврсти кристални супстанции, но не и да се следи електрохемиска активност и да добиваме податоци за топографијата. [24].

SECM може да се користи без оглед на тоа дали примерокот е спроводлив во целост или пак неспроводлив, па дури може да се вршат мерења и на спроводни региони изолирани во изолациона матрица. Токму ова својство ја прави SECM високо флексибила и применлива во широк спектар на области. Тоа значи дека SECM може да се користи за мерење на примероци кои тешко би можеле да се измерат генерално во електрохемијата, поради тоа што електричниот контакт кај таквите системи не може лесно да се оствари. Системи

во кои се користи оваа техника вклучуваат гранични површини помеѓу две течности, биолошки материјали, 2D материјали. SECM има селективност кон медијаторот што се користи при мерењето. Ова значи дека може да се испита интеракцијата на специфични хемикалии со примерокот, што е од особена важност при проучувањето на катализатори, интеракции на антиген-сензор, како и ослободување на метаболити од биолошки молекули. Денес, скенирачката електрохемиска микроскопија има голем број апликации во важни сегменти од биохемијата, физиката, науката за материјали и хемијата. Така на пример, со оваа техника може многу лесно да се добијат релевантни податоци за природата и брзината на процесите на корозија [1, 2, 8], структурата и активноста на голем број легури, што е од исклучителна важност во науката за материјали [3].

Придобивките од апликацијата на SECM за студирање на биохемиски процеси на единечни клетки се повеќекратни. Покрај тоа што може да се определи и визуелизира топографската активност на голем број клетки, можно е да се определат и кинетички параметри, како коефициентот на дифузија и константа на брзина на пренос на електрони за дадени физиолошки активни супстанции [3, 5, 6, 8]. Овие податоци се важни да се разберат феномените на трансфер на маса и трансферот на електрони при функционирањето на одредени механизми во клетките [5, 6]. Дизајнирањето на ензимски биосензори за детекција на физиолошки активни супстанции овозможува да се конструираат специфични електронски системи што ќе овозможат прецизна детекција на важни биохемиски системи. И покрај големиот потенцијал и можностите што ги нуди SECM, примената на оваа техника денес е лимитирана на мал број истражувачки лаборатории, главно поради многу високата цена на целокупната инструментација.

Како главен проблем кај SECM се јавува загадувањето на ултрамикро електродите, посебно поради процесите на адсорпција што се јавуваат кога SECM се аплицира во биолошки примероци. Покрај тоа, електрохемиската активност на некои интерферентни супстанции што често се присутни во комплексен матрикс, е исто така проблем што често се јавува во SECM и влијае врз точноста на добиените резултати. Непожелните хемиски реакции што често се случуваат во биолошки матрикси, како и фазните трансформации присутни кај голем број на системи дополнително ја лимитираат пошироката употреба на SECM за аналитички цели.

REFERENCES

- [1] Stoica L.; Neugebauer S.; Schuhmann W. *Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) as a Tool in Biosensor Research*; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 455–492, 2007. https://sci-hub.do/10.1007/10_2007_082
- [2] Bard A. J.; Fan F. R. F.; Kwak J.; Lev O. *Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles*; Analytical Chemistry, 61 (2), 132-138, 1989. <https://sci-hub.do/10.1021/ac00177a011>
- [3] Polcari D.; Dauphin-Ducharme P.; Mauzeroll J. *Scanning Electrochemical Microscopy: A Comprehensive Review of Experimental Parameters from 1989 to 2015*, Chem. Rev. 116, 13234-13278, 2016. <https://sci-hub.do/10.1021/acs.chemrev.6b00067>
- [4] Huang L.; Li Z.; Lou Y.; Cao F.; Zhang D.; Li X. *Recent Advances in Scanning Electrochemical Microscopy for Biological Applications*; Materials, 11(8), 1389, 2018. <https://sci-hub.do/https://doi.org/10.3390/ma11081389>
- [5] Edwards M. A.; Martin S.; Whitworth A. L.; Macpherson J. V.; Unwin P. R. *Scanning electrochemical microscopy: principles and applications to biophysical systems*; Physiological Measurement, 27(12), R63–R108, 2006. <https://sci-hub.do/10.1088/0967-3334/27/12/r01>
- [6] Ummadi J. G.; Joshi V. S.; Gupta P. R.; Indra A. K.; Koley D. *Single-cell migration as studied by scanning electrochemical microscopy*; Analytical Methods, 7(20), 8826–8831, 2015. <https://sci-hub.do/10.1039/c5ay01944c>
- [7] Heß C.; Borgwarth K.; Ricken C.; Ebling D. G.; Heinze J. *Scanning electrochemical microscopy: Study of silver deposition on non-conducting substrates*; Electrochimica Acta, 42 (20-22), 3065–3073, 1997. [https://sci-hub.do/10.1016/s0013-4686\(97\)00154-0](https://sci-hub.do/10.1016/s0013-4686(97)00154-0)
- [8] Wittstock G.; Burchardt M.; Pust S. E.; Shen Y.; Zhao C. *Scanning Electrochemical Microscopy for Direct Imaging of Reaction Rates*; Angewandte Chemie International Edition, 46 (10), 1584–1617, 2007). <https://sci-hub.do/10.1002/anie.200602750>
- [9] Mirčeski V.; Gulaboski R. *Surface Catalytic Mechanism in Square-Wave Voltammetry*; Electroanalysis, 1326-1334,2001. [https://sci-hub.do/https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200111\)13:16%3C1326::AID-ELAN1326%3E3.0.CO;2-S](https://sci-hub.do/https://doi.org/10.1002/1521-4109(200111)13:16%3C1326::AID-ELAN1326%3E3.0.CO;2-S)
- [10] Gulaboski R.; Kokoskarova P.; Petkovska S. *Time-Independent Methodology to Access Michaelis-Menten Constant by Exploring Electrochemical-Catalytic Mechanism in Protein-Film Cyclic Staircase Voltammetry*; Croatica Chemica Acta, 91, 2018. <https://sci-hub.do/10.5562/cca3383>

- [11] Gulaboski R ; Petkovska S. *A time-independent approach to evaluate the kinetics of enzyme-substrate reactions in cyclic staircase voltammetry*; *Anal&Bioanal Electrochem.* 10, 566-575, 2018. [2018, 10\(5\), 566-575.pdf \(abechem.ir\)](https://doi.org/10.1016/j.abechem.2018.10.005)
- [12] Gulaboski R.; Mirceski V. *New aspects of the electrochemical-catalytic (EC') mechanism in square-wave voltammetry*; *Electrochimica Acta*, 167, 219-225, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.03.175>
- [13] Petkovska S.; Gulaboski R. *Theoretical Analysis of a Surface Catalytic Mechanism Associated with Reversible Chemical Reaction under Conditions of Cyclic Staircase Voltammetry*; *Electroanalysis* 32, 992-1004, 2020. <https://doi.org/10.1002/elan.201900698>
- [14] Petkovska S.; Gulaboski R. *Diffusional Electrochemical Catalytic (EC') Mechanism Featuring Chemical Reversibility of Regenerative Reaction-Theoretical Analysis in Cyclic Voltammetry*; *Croatica Chemica Acta* 92 (4), 495-502, 2019. <https://doi.org/10.5562/cca3607>
- [15] Ciobanu M.; Taylor D. E.; Wilburn J. P.; Cliffel D. E. *Glucose and Lactate Biosensors for Scanning Electrochemical Microscopy Imaging of Single Live Cells*; *Analytical Chemistry*, 80(8), 2717–2727, 2008. <https://doi.org/10.1021/ac7021184>
- [16] Torisawa Y.; Kaya T.; Takii Y.; Oyamatsu D.; Nishizawa M.; Matsue T. *Scanning Electrochemical Microscopy-Based Drug Sensitivity Test for a Cell Culture Integrated in Silicon Microstructures*; *Analytical Chemistry*, 75(9), 2154–2158, 2003. <https://doi.org/10.1021/ac026317u>
- [17] Liu B.; Rotenberg S. A.; Mirkin M. V. *Scanning Electrochemical Microscopy of Living Cells. 4. Mechanistic Study of Charge Transfer Reactions in Human Breast Cells*; *Analytical Chemistry*, 74(24), 6340–6348, 2002. <https://doi.org/10.1021/ac020564g>
- [18] Feng W.; Rotenberg S. A.; Mirkin M. V. *Scanning Electrochemical Microscopy of Living Cells. 5. Imaging of Fields of Normal and Metastatic Human Breast Cells*; *Analytical Chemistry*, 75(16), 4148–4154, 2003. <https://doi.org/10.1021/ac0343127>
- [19] Kurulugama R. T.; Wipf D. O.; Takacs S. A.; Pongmayteegul S.; Garris P. A.; Baur J. E. *Scanning Electrochemical Microscopy of Model Neurons: Constant Distance Imaging*; *Analytical Chemistry*, 77(4), 1111–1117, 2005. <https://doi.org/10.1021/ac048571n>
- [20] Mauzeroll J.; Bard A. J. *Scanning electrochemical microscopy of menadione-glutathione conjugate export from yeast cells*; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), 7862–7867, 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402556101>

- [21] Turcu F. *Imaging immobilised ssDNA and detecting DNA hybridisation by means of the repelling mode of scanning electrochemical microscopy (SECM)*; *Biosensors and Bioelectronics*, 20(5), 925–932, 2004. <https://sci-hub.do/10.1016/j.bios.2004.06.011>
- [22] Roberts W. S.; Davis F.; Higson S. P. J. *Scanning electrochemical microscopy of genomic DNA microarrays—study of adsorption and subsequent interactions*; *The Analyst*, 134 (7), 1302, 2009. <https://sci-hub.do/10.1039/b822282g>
- [23] Doménech-Carbó A.; Cebrián-Torrejón G.; de Miguel L.; Tordera V.; Rodrigues-Furtado D.; Assad-Kahn S.; Poupon E. *dsDNA, ssDNA, G-quadruplex DNA, and nucleosomal DNA electrochemical screening using canthin-6-one alkaloid-modified electrodes*; *Electrochimica Acta*, 115, 546–552, 2014. <https://sci-hub.do/10.1016/j.electacta.2013.11.025>
- [24] Ebeling D.; Solares S. D. *Bimodal atomic force microscopy driving the higher eigenmode in frequency-modulation mode: Implementation, advantages, disadvantages and comparison to the open-loop case*; *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 4, 198–207, 2013. <https://sci-hub.do/10.3762/bjnano.4.20>
- [25] **R. Gulaboski**, V. Mirceski, R. Kappl, M. Hoth, M. Bozem, "Quantification of Hydrogen Peroxide by Electrochemical Methods and Electron Spin Resonance Spectroscopy" *Journal of Electrochemical Society*, 166 (2019) G82-G101.
- [26] **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirceski, Milivoj Lovric, Square-wave protein-film voltammetry: new insights in the enzymatic electrode processes coupled with chemical reactions, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 23 (2019) 2493-2506.
- [27] **Rubin Gulaboski**, Electrochemistry in 21st Century-Future Trends and Perspectives, *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) doi:10.1007/s10008-020-04550-0
- [28] Milkica Janeva, Pavlinka Kokoskarova, Viktorija Maksimova, **Rubin Gulaboski***, Square-wave voltammetry of two-step surface redox mechanisms coupled with chemical reactions—a theoretical overview, *Electroanalysis*, 31 (2019) 2488-2506.
- [29] **Rubin Gulaboski**, Milkica Janeva, Viktorija Maksimova, "New Aspects of Protein-film Voltammetry of Redox Enzymes Coupled to Follow-up Reversible Chemical Reaction in Square-wave Voltammetry", *Electroanalysis*, 31 (2019) 946-956
- [30] **Rubin Gulaboski**, Pavlinka Kokoskarova, Sonja Risafova, "Analysis of Enzyme-Substrate Interactions from Square-Wave Protein-Film Voltammetry of Complex Electrochemical-Catalytic Mechanism Associated with Reversible Regenerative Reaction" *Journal of Electroanalytical Chemistry* 866 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114189>
- [31] **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirceski, Sebojka Komorsky Lovric, Milivoj Lovric, "Three-phase electrodes: Simple and Efficient Tool for Analysis of Ion Transfer Processes Across Liquid-Liquid Interface. Twenty Years On" *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) <https://link.springer.com/article/10.1007/s10008-020-04629-8>
- [32] **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirceski, "Simple Voltammetric Approach for Characterization of Two-step Surface Electrode Mechanism in Protein-Film

Voltammetry", *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) <https://link.springer.com/article/10.1007/s10008-020-04563-9>.

[33] Milkica Janeva, Pavlinka Kokoskarova, **Rubin Gulaboski***, "Multistep Surface Electrode Mechanism Coupled with Preceding Chemical Reaction-Theoretical Analysis in Square-Wave Voltammetry" *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry* 12 (2020) 766-779.

[34] P. Kokoskarova, M. Janeva, V. Maksimova, **Rubin Gulaboski***, "Protein-film Voltammetry of Two-step Electrode Enzymatic Reactions Coupled with an Irreversible Chemical Reaction of a Final Product-a Theoretical Study in Square-wave Voltammetry", *Electroanalysis* 31 (2019) 1454-1464, DOI: 10.1002/elan.201900225

[35] P. Kokoskarova, **Rubin Gulaboski***, Theoretical Aspects of a Surface Electrode Reaction Coupled with Preceding and Regenerative Chemical Steps: Square-wave Voltammetry of a Surface CEC' Mechanism, *Electroanalysis* (2019) 333-344 doi.org/10.1002/elan.201900491

[36] **Rubin Gulaboski**, I. Bogeski, P. Kokoskarova, H. H. Haeri, S. Mitrev, M. Stefova, Marina, J. Stanoeva-Petreska, V. Markovski, V. Mirceski, M. Hoth, and R. Kappel, *New insights into the chemistry of Coenzyme Q-0: A voltammetric and spectroscopic study. Bioelectrochemistry* 111 (2016) 100-108.

[37] **Rubin Gulaboski**, V. Markovski, and Z. Jihe, *Redox chemistry of coenzyme Q—a short overview of the voltammetric features*, *Journal of Solid State Electrochemistry* 20 (2016) 3229-3238.

[38] Haeri, Haleh H. I. Bogeski, **Rubin Gulaboski**, V. Mirceski, M. Hoth, and R. Kappel, *An EPR and DFT study on the primary radical formed in hydroxylation reactions of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone*. *Mol. Phys.* 114 (2016) 1856-1866.