

Определение характера взаимодействия биоактивных ионов с фосфолипидными мембранами методами нелинейной микроскопии

М. Ю. Еремчев¹⁾, А. В. Наумов

Троицкое обособленное подразделение Физического института имени П. Н. Лебедева РАН, 108840 Троицк, Москва, Россия

Поступила в редакцию 5 декабря 2024 г.

После переработки 11 декабря 2024 г.

Принята к публикации 12 декабря 2024 г.

Исследование электростатических и химических взаимодействий и превращений на поверхности липидных мембранах имеет ключевое значение для оценки эффективности и токсичности различных лекарственных препаратов, а также механизмов их доставки. Описание этих взаимодействий на молекулярном уровне требует применения высокочувствительных неинвазивных методов. В данной работе представлены экспериментальные результаты, демонстрирующие потенциал микроскопии генерации второй гармоники при исследовании электрохимических процессов затрагивающих структуру узкого гидратного слоя (< 1 нм) модельных клеточных мембран. На примере биоактивных ионов калия и кальция различной концентрации показана уникальная чувствительность данного метода к изменению значения поверхностного потенциала мембран. Повышение ионной силы раствора выше 15 мМ в случае ионов кальция приводит к полной нейтрализации поверхности мембраны, в то время как ионы калия лишь частично экранируют поверхностный заряд мембраны. Показано, что изменение структуры и состава мембран приводит к возникновению стерических эффектов во взаимодействии головных групп липидов с молекулами воды в гидратном слое.

DOI: 10.31857/S0370274X25020124, EDN: HHJWVJ

Введение. Современные методы фотоники играют ключевую роль в развитии междисциплинарных исследований, открывая новые горизонты для понимания биологических процессов на молекулярном уровне [1–6]. Нелинейно-оптическая микроскопия стала мощным инструментом визуализации биологических объектов, обеспечивающая безмаркерную, неинвазивную и химически специфическую визуализацию сложных тканей с субклеточным разрешением [7]. В частности, микроскопия генерации второй гармоники (ГВГ) обрела широкую популярность как инструмент визуализации биологических тканей благодаря уникальным правилам отбора запрещающим когерентную генерацию фотонов от симметричных/изотропных сред [8]. Это делает ГВГ микроскопию исключительно чувствительной к асимметричным структурам в изотропных средах, таким как коллаген или фибриллярные белки [9–11].

Развитие этого метода имеет также особое значение для неинвазивного исследования процессов на поверхности липидных мембран. Биологические липидные мембраны образуют сложный динамичный барьер между внутренним объемом живой клетки и окружающей средой. Изучение электрических и хи-

мических взаимодействий между ионами и липидными мембранами имеет решающее значение для понимания клеточных функций [12–14]. Положительно заряженные катионы приводят к изменению структуры двойного электрического слоя [15], формированию химически связанных кластеров [16], модификации гидратации полярных групп липидов [17], нейтрализации и даже изменению заряда мембраны [18]. При этом двухвалентные ионы оказывают существенное воздействие на структуру поверхности анионных мембран уже при микромолярных концентрациях [19], в сравнении с моновалентными ионами, воздействие которых становится сопоставимым при концентрациях на 3–5 порядков выше [20]. Эти взаимодействия влияют на структуру, динамику и электростатический потенциал мембран [17], образование микродоменов [21], а также могут индуцировать деформацию мембраны [22, 23]. Состав липидной мембраны и ионного окружения вокруг действующих ионных каналов может существенно отличаться от состава невозмущенной мембраны [24]. Однако изучение этих процессов затруднено, из-за труднодоступности и хрупкости мембран, подвешенных в водной фазе, что требует использования неинвазивных методов визуализации и диагностики с избирательной чувствительностью к интерфейсам. Боль-

¹⁾e-mail: maks.ermchev@gmail.com

шинство исследований липидных мембран производится с помощью методов флуоресцентной микроскопии, требующих внедрение в состав мембраны искусственных молекул красителя [25]. Как следствие, практически отсутствуют знания о роли гидратации мембран, несмотря на то, что без воды липидный бислой мембран существовать не может.

Вследствие избирательности по симметрии метод ГВГ является исключительно чувствительным для изучения и визуализации интерфейсов [26]. Причем в случае границы раздела двух изотропных сред, нелинейный контраст, как правило, возникает в пределах нескольких нанометров в направлении, перпендикулярном поверхности [27]. Из-за низкого нелинейного отклика упорядоченных молекул на поверхности этот тип экспериментов традиционно проводился с использованием резонансного усиления [28, 29], либо в режиме одноканального детектирования с большими временами накопления (от десятков минут до часов). Развитие методов нелинейной микроскопии за последние 10 лет позволило расширить границы применимости данного метода, что позволило проводить безмаркерную визуализацию водных интерфейсов (в том числе и мембран) с субсекундным временным разрешением [30–32].

Основным источником ГВГ контраста в данном методе являются упорядоченные (за счет электрохимических взаимодействий) молекулы воды в непосредственной близости от интерфейса, формирующие так называемый гидратный слой мембраны [33, 34]. Взаимодействие с ионами и молекулами в окружающем растворе оставляет специфический след в структуре данного слоя, который может быть количественно измерен в ГВГ контрасте. Данный метод был успешно применен для исследования пространственного распределения двухвалентных ионов в гидратном слое мембран, что позволило описать неизвестный ранее процесс транспорта таких ионов через липидные мембраны [35, 36].

В данной работе представлены результаты, демонстрирующие потенциал данного метода при исследовании электрохимических процессов, затрагивающих структуру гидратного слоя модельных клеточных мембран. В частности, исследовано влияние валентности и концентрации ионов на электростатическое экранирование мембран, а также показано, что структура гидратного слоя мембраны подвержена влиянию стерических эффектов, а также формированию двойного электрического слоя.

Результаты. Представленные в данной работе исследования проводились на модельных липидных мембранных в виде гигантских однослой-

ных везикул, позволяющих точно контролировать как состав мембраны, так и состав водных растворов по обе стороны от мембраны. Везикулы были сформированы методом спонтанного роста на полимерной подложке [37] из смеси нейтральных (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)) и анионных липидов (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (DPhPA) или 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DPhPS)). Распределение липидов в таких везикулах получается однородным, что обеспечивает равные величины поверхностных зарядов на обеих сторонах мембраны. Как следствие, ориентация и структура молекул воды в гидратных слоях мембраны внутри и снаружи везикулы в среднем также одинаковая. Как было показано ранее, сформированная таким образом везикулы не могут быть визуализированы в контрасте ГВГ [31]. Это происходит из-за деструктивной интерференции возникающих нелинейных волн от близко расположенных и противоположно направленных интерфейсов мембраны. Количественно, интенсивность ГВГ можно выразить через значение поверхностных потенциалов на обеих сторонах мембраны [38]:

$$I(2\omega) \propto I(\omega)^2 |\Phi_{0,1} - \Phi_{0,2}|^2, \quad (1)$$

где Φ_0 – поверхностный потенциал на внутренней/внешней стороне мембраны. Таким образом, возникновение ГВГ сигнала возможно только при $\Delta\Phi_0$ отличном от нуля, т.е. при возникновении трансмембранного электростатического потенциала. Такие условия можно достичь, например, за счет изменения ионного состава или pH окружающего раствора на одной стороне мембраны, как схематично показано на рис. 1а. Эти изменения приведут к частичному или полному разупорядочиванию молекул воды в гидратном слое мембраны и, как следствие, к возникновению ГВГ контраста. Рисунок 1b показывает гистограмму усредненного ГВГ сигнала от симметричных по составу везикул, помещенных в водные растворы с ионами калия и кальция при разных концентрациях (ионных силах). Во всех экспериментах везикулы помещались в изосолярные условия, чтобы исключить влияния эффектов, связанных с осмотическим давлением. Обработка результатов производилась для везикул одинакового размера (~ 20 мкм в диаметре). Усреднение проводилось как минимум по 10 различным везикулам.

Из рисунка 1b видно, что интегральная интенсивность ГВГ сигнала зависит от концентрации и валентности ионов, а значит и от величины ион-липидных взаимодействий. Моновалентные и двух-

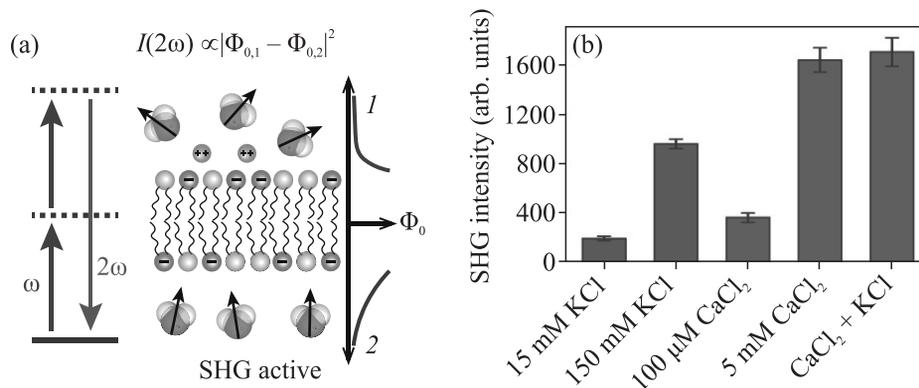


Рис. 1. (Цветной онлайн) (а) – Схематическое представление анионной липидной мембраны с асимметричной структурой гидратных слоев с одной и другой стороны, что делает ее активной в контрасте ГВГ. (б) – Гистограмма распределения средних интенсивностей одинаковых по составу анионных везикул (1:1 DPhPC:PA), помещенных в водные растворы с ионами калия и кальция при разных концентрациях. Последняя колонка соответствует таким же по составу везикулам, помещенным в водный раствор с 5 мМ CaCl_2 и 100 мМ KCl

валентные ионы калия и кальция с одинаковой ионной силой в 15 мМ в растворе ($I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N c_i z_i^2$, где c_i – молярная концентрация ионов, z_i – заряды ионов) оказывают различное воздействие на структуру гидратного слоя мембран. Ионы кальция образуют химически связанные кластеры с анионными липидными группами, что может приводить к полной нейтрализации части интерфейса [18], в то время как ионы калия за счет электростатического экранирования лишь уменьшают дебаевскую длину взаимодействия. Добавление существенно меньших концентраций двухвалентных ионов кальция все равно приводит к большему возмущению структуры гидратного слоя мембран, по сравнению с моновалентными ионами (15 мМ KCl против 100 мкМ CaCl_2 на рис. 1b).

Увеличение концентрации CaCl_2 в растворе выше 5 мМ (вплоть до 20 мМ, когда мембраны становятся нестабильными и легко лопаются) не приводит к дальнейшему увеличению интенсивности ГВГ. Это свидетельствует о достижении режима полной нейтрализации внешней поверхности мембраны. Данное наблюдение дополнительно подтверждается в экспериментах, в которых помимо 5 мМ CaCl_2 во внешнем растворе присутствует 100 мМ KCl . Как видно из гистограммы 1b, это не приводит к дальнейшему увеличению интенсивности ГВГ сигнала, что является дополнительным подтверждением полной электростатической нейтральности внешней поверхности мембраны при концентрации ионов кальция в 5 мМ.

Полученные экспериментальные данные позволяют оценить различие в константах связывания K_D между ионами кальция/калия и анионными липидами в мембране. Отношение ГВГ интенсивности от

везикул помещенных во внешний раствор калия и кальция одинаковой ионной силы в 15 мМ в соответствии с рис. 1b составляет $I_{\text{Ca}^{2+}}/I_{\text{K}^+} = 8.3$. Согласно формуле 1, это, в свою очередь, приводит к разнице возникающего трансмембранного потенциала в 2.9 раз, что в свою очередь пропорционально изменению свободной энергии взаимодействия ΔG ($\Delta G = 2e\Delta\Phi_0$). Константу ион-липидной диссоциации K_D можно оценить из $\Delta G \propto -RT \ln(K_D)$. Таким образом, наблюдаемая константа диссоциации для ионов кальция примерно на 3 порядка выше константы диссоциации моновалентных ионов калия. Константа ассоциации ионов калия к анионным липидам известна из литературы и составляет порядка 0.2 M^{-1} [20, 39], в то время как литературные значения констант ассоциации ионов кальция, полученных разными методами, достаточно сильно разнятся между собой. К примеру, значение константы диссоциации ионов кальция к фосфатидилсериновым (PS) мембранам, полученных методом электрокинетической подвижности, составляет порядка $1-10 \text{ M}^{-1}$ [16, 40], в то время как изотермическая калориметрия титрования дает существенно большие величины: от $10-20 \text{ M}^{-1}$ [41] до 10^2-10^4 M^{-1} [19, 22, 42]. Несмотря на наблюдаемый разброс значений, литературные данные сходятся на том, что константа ассоциации кальция должна быть на несколько порядков выше константы ассоциации калия, что хорошо согласуется с данными, полученными в данной работе.

Полученный режим полного электростатического экранирования открывает возможность для исследования взаимодействий только на внутренней поверхности мембраны. Интенсивность наблюдаемого сигнала в таком случае будет пропорциональна по-

верхностному потенциалу исключительно внутренней поверхности мембраны: $I(2\omega) \propto I(\omega)^2 |\Phi_0|^2$. Данный прием будет использован в дальнейшем для исследования структуры гидратного слоя мембраны в зависимости от плотности поверхностных зарядов и химической структуры головных групп липидов.

Рисунок 2 показывает распределение интенсивности ГВГ сигнала для везикул, сформированных из смеси анионных/нейтральных липидов в соотношении 1:1 и 1:9, помещенных в 5 мМ водный раствор CaCl_2 . Для каждого типа образца было измерено не менее 10 различных везикул. В исследуемых мембранах количество анионных головных групп отличается в 5 раз, что в случае полной ионизации должно приводить к разнице ГВГ сигнала в 25 раз. Однако наблюдаемое отношение средних значений интенсивности двух смесей липидов составляет лишь 3.4. Наблюдаемое отличие между анионными везикулами разного состава, вероятно, связано с формированием двойного электрического слоя катионов на поверхности мембраны, а также с неполной ионизацией липидов (большая часть анионных липидов на внутренней поверхности мембраны остается не ионизированными) [43, 44].

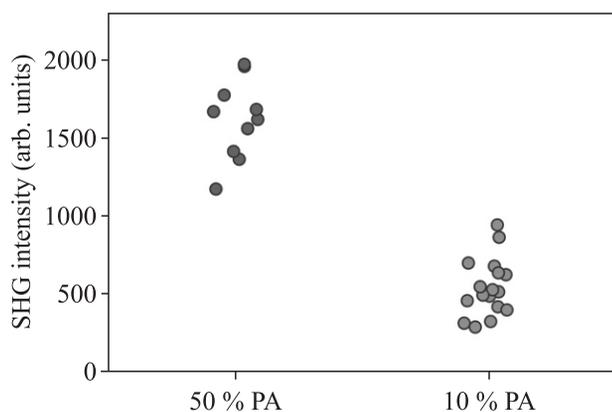


Рис. 2. (Цветной онлайн) Сравнение ГВГ интенсивностей от везикул с различным анионным составом, помещенных во внешний раствор CaCl_2

Как было показано выше, ГВГ весьма чувствительна к изменению электростатического окружения липидных мембран за счет влияния ионного состава раствора и поверхностной плотности зарядов на упорядочение молекул воды на интерфейсе. Для того, чтобы показать влияние молекулярного строения липидов на структуру гидратного слоя мембран, была проведена серия экспериментов, в которой при неизменном электростатическом составе и окружении мембран, менялась структура головных групп анионных липидов. Рисунок 3а показывает структу-

ру анионных липидов DPhPA и DPhPS, используемых в формировании мембран. Обе молекулы имеют схожее строение и отличаются лишь на дополнительную функциональную группу L-серин в молекулах DPhPS (отмеченной на рис. 3а).

Рисунок 3б показывает сравнение средних ГВГ интенсивностей от везикул, сформированных из смеси анионных (DPhPS/A) и нейтральных (DPhPC) липидов в соотношении 1:1, помещенных в 5 мМ водный раствор CaCl_2 . Интенсивность ГВГ от мембран с головными группами PA примерно в 2.6 раза выше, чем от мембран с группами PS. Это различие может быть объяснено стерическим эффектом – головная группа PA меньше по размеру, что делает ее более открытой для взаимодействия с молекулами воды. Напротив, присутствие L-серин группы в липидах PS усложняет доступ молекул воды к отрицательно заряженной части фосфолипида, что также уменьшает доступный объем взаимодействия.

Изменение состава гидрофобного ядра мембраны путем использования липидов с различной структурой жирных кислот, а также добавления молекул холестерина не приводило к заметному изменению интенсивности ГВГ для обеих групп везикул (PS и PA). Это означает, что упаковка и упорядоченность молекул липидов в мембране не влияет на структуру гидратного слоя.

Материалы и методы.

Формирование везикул. Гигантские однослойные везикулы были сформированы методом спонтанного роста на полимерной подложке из поливинилового спирта (ПВС), который был нанесен на покровное стекло. Липиды каждого вида (DPhPC, DPhPA, DPhPS) растворялись в хлороформе до достижения концентрации в 5 мг/мл. Полученные растворы смешивались в нужной пропорции (1:1 или 1:9) и осаждались на подложку ПВС с помощью пипеточного дозатора. После испарения хлороформа, к липидной пленке добавлялся раствор сахарозы требуемой концентрации, чтобы соответствовать осмолярности раствора с ионами. Рост везикул происходил в течение 15–20 мин, после чего везикулы перемещались в чашку Петри (с помощью пипеточного дозатора), заполненную раствором глюкозы, а также солью KCl и/или CaCl_2 . Концентрация глюкозы также подбиралась из расчета изоосмолярных условий внутри и снаружи везикулы. Используемые липиды находятся во флюидной фазе в широком диапазоне температур, включая комнатную.

Экспериментальная установка. Регистрация ГВГ изображений производилась на созданном в лаборатории нелинейном микроскопе. В плоскости

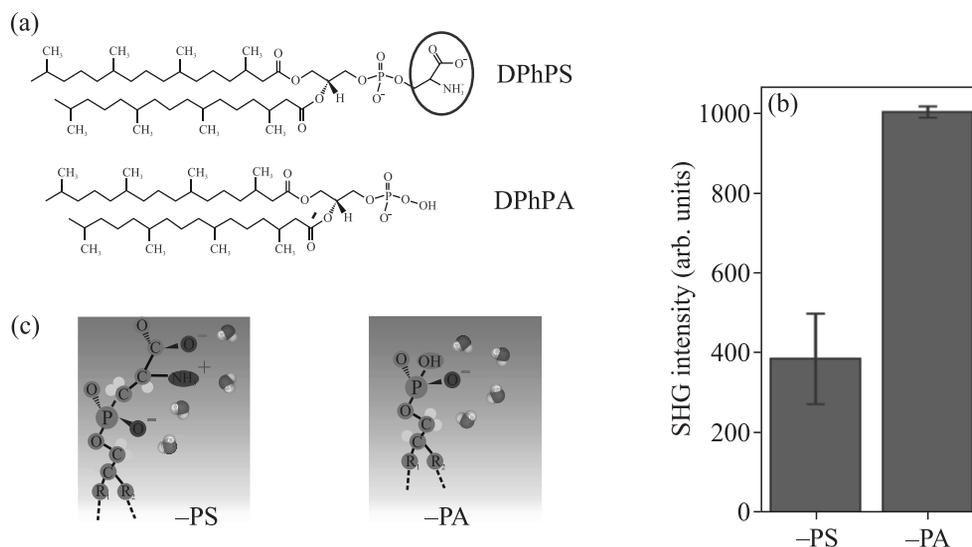


Рис. 3. (Цветной онлайн) (а) – Химическая структура анионных липидов DPhPS и DPhPA. (б) – Сравнение ГВГ интенсивностей от везикул имеющих различную структуру анионных липидов, помещенных во внешний раствор CaCl_2 . (с) – Схематическая визуализация взаимодействия анионных головных групп с молекулами воды в гидратном слое

образца создавалось широкополное пятно возбуждения 80 мкм в диаметре за счет фокусирования фемтосекундного лазерного излучения (1030 нм, 400 кГц, < 200 фс) 200 мм линзой в заднюю фокальную плоскость водо-иммерсионного объектива. Сигнал от образца собирался в геометрии на пропускание с помощью второго водо-иммерсионного микрообъектива и регистрировался с помощью высокочувствительной камеры. В схеме регистрации присутствовал набор интерференционных фильтров и дихроичных зеркал для спектрального разделения ГВГ сигнала (515 нм) от лазера накачки (1030 нм).

Заключение. Представленные в данной работе результаты демонстрируют высокий потенциал микроскопии генерации второй гармоники для неинвазивной характеристики молекулярных физико-химических процессов на поверхности липидных мембран. Хотя модельные системы, с одной стороны, не позволяют учесть всего разнообразия электрохимических взаимодействий присущих клеточным мембранам, однако они являются идеальной системой для изучения определенных типов взаимодействия, которые сложно измерить без интерференции от внешних факторов. В настоящей работе показано, что валентность и концентрация ионов в значительной мере влияют на структуру гидратного слоя мембраны. Увеличение количества анионных липидов в мембране не приводит к пропорциональному увеличению поверхностного потенциала за счет неполной ионизации липидов и формирования двойного электрического слоя.

Изменение химической структуры головных групп липидов при неизменном заряде поверхности приводит к появлению стерических эффектов, связанных с труднодоступностью отрицательно заряженных групп молекулами воды. В дальнейшем накопленная база знаний позволит исследовать более сложные процессы, связанные с влиянием осмотического давления, переносом ионов и веществ через мембрану, а также взаимодействием с различными наночастицами.

Финансирование работы. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (Физический институт имени П.Н. Лебедева РАН) на поддержку новой научной группы 33-2024. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

1. Ю. С. Петронюк, Е. А. Храмова, В. М. Левин, А. П. Бонарцев, В. В. Воинова, Г. А. Бонарцева, А. А. Мураев, Т. Ф. Асфаров, Н. А. Гусейнов, Известия Российской академии наук. Серия физическая **84**(6), 799 (2020); <https://doi.org/10.31857/S0367676520060204>.
2. В. О. Компанец, С. И. Кудряшов, Э. Р. Толордава, С. Н. Шельгина, В. В. Соколова, И. Н. Сараева, М. С. Ковалев, А. А. Ионин, С. В. Чекалин, Письма в ЖЭТФ **113**(6), 365 (2021); <https://doi.org/10.31857/S1234567821060021>.

3. Д. Ю. Мартиросян, А. А. Осыченко, А. Д. Залесский, О. Т. Калинина, У. А. Точило, Ю. А. Федотов, М. С. Сырчина, В. А. Надточенко, Письма в ЖЭТФ **117**(11), 876 (2023); <https://doi.org/10.31857/S1234567823110125>.
4. N. V. Surovtsev, A. A. Dmitriev, and S. A. Dzuba, Phys. Rev. E **95**(3), 032412 (2017); <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.95.032412>.
5. A. Zalygin, D. Solovyeva, I. Vaskan, S. Henry, M. Schaefer, P. Volynsky, A. Tuzikov, E. Korchagina, I. Ryzhov, A. Nizovtsev, K. Mochalov, R. Efremov, E. Shtykova, V. Oleinikov, and N. Bovin, ChemistryOpen **9**(6), 641 (2020); <https://doi.org/10.1002/open.201900276>.
6. M. E. Stepanov, S. A. Khorkina, A. I. Arzhanov, A. V. Karabulin, V. I. Matyushenko, and A. V. Naumov, Pis'ma v ZhETF **120**(4), 231 (2024); <https://doi.org/10.31857/S0370274X24080129>.
7. A. S. Chebotarev, V. S. Ledyeva, O. I. Patsap, A. A. Ivanov, and A. B. Fedotov, J. Biophotonics **16e202300228** (2023); <https://doi.org/10.1002/jbio.202300228>.
8. R. W. Boyd, Nonlinear Optics, 3rd ed., Academic Press, Rochester, N.Y. USA (2008).
9. P. J. Campagnola and L. M. Loew, Nat. Biotechnol. **21**(11), 1356 (2003); <https://doi.org/10.1038/nbt894>.
10. X. Chen, O. Nadiarynh, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, Nat. Protoc. **7**(4), 654 (2012); <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.009>.
11. S. Brasselet, Adv. Opt. Photonics **3**(3), 205 (2011); <https://doi.org/10.1364/AOP.3.000205>.
12. E. Deplazes, B. D. Tafalla, C. G. Cranfield, and A. Garcia, J. Phys. Chem. Lett. **11**(15), 6353 (2020); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c01479>.
13. F. Ahmadpoor and P. Sharma, Nanoscale **7**(40), 16555 (2015); <https://doi.org/10.1039/C5NR04722F>.
14. S. Ray, A. Kassan, A. R. Busija, P. Rangamani, and H. H. Patel, Am. J. Physiol.-Cell Physiol. **310**(3), C181 (2016); <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00087.2015>.
15. Y. A. Ermakov, Membranes **13**(11), 883 (2023); <https://doi.org/10.3390/membranes13110883>.
16. A. McLaughlin, C. Grathwohl, and S. McLaughlin, Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr. **513**(3), 338 (1978); [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90203-1).
17. H. Binder and O. Zschörnig, Chem. Phys. Lipids **115**(1), 39 (2002); [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00005-1).
18. A. Melcrová, S. Pokorna, S. Pullanchery, M. Kohagen, P. Jurkiewicz, M. Hof, P. Jungwirth, P. S. Cremer, and L. Cwiklik, Sci. Rep. **6**(1), 38035 (2016); <https://doi.org/10.1038/srep38035>.
19. Y. A. Ermakov, K. Kamaraju, A. Dunina-Barkovskaya, K. S. Vishnyakova, Y. E. Yegorov, A. Anishkin, and S. Sukharev, Biochemistry **56**(40), 5457 (2017); <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00644>.
20. Y. A. Ermakov, Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr. **1023**(1), 91 (1990); [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90013-E](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90013-E).
21. J. L. Richens, J. S. Lane, J. P. Bramble, and P. O'Shea, Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr. **1848**(9), 1828 (2015); <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.017>.
22. Z. T. Graber, Z. Shi, and T. Baumgart, Phys. Chem. Chem. Phys. **19**(23), 15285 (2017); <https://doi.org/10.1039/C7CP00718C>.
23. S. A. Akimov, M. A. Polynkin, I. Jiménez-Mungu'a, K. V. Pavlov, and O. V. Batishchev, Int. J. Mol. Sci. **19**(5), 1358 (2018); <https://doi.org/10.3390/ijms19051358>.
24. O. B. Tarun, M. Yu. Eremchev, A. Radenovic, and S. Roke, Nano Lett. **19**(11), 7608 (2019); <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02024>.
25. R. Dimova and C. Marques, *The Giant Vesicle Book*, CRC Press, Boca Raton, USA (2019).
26. X. Chen, W. Hua, Z. Huang, and H. C. Allen, J. Am. Chem. Soc. **132**(32), 11336 (2010); <https://doi.org/10.1021/ja1048237>.
27. K. B. Eisenthal, Chem. Rev. **96**(4), 1343 (1996); <https://doi.org/10.1021/cr9502211>.
28. T. T. Nguyen and J. C. Conboy, Anal. Chem. **83**(15), 5979 (2011); <https://doi.org/10.1021/ac2009614>.
29. L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz, JOSA B **17**(10), 1685 (2000); <https://doi.org/10.1364/JOSAB.17.001685>.
30. C. Macias-Romero, I. Nahalka, H. I. Okur, and S. Roke, Science **357**(6353), 784 (2017); <https://doi.org/10.1126/science.aal4346>.
31. M. Eremchev, D. Roesel, P.-M. Dansette, A. Michailovas, and S. Roke, Biointerphases **18**(3), 031202 (2023); <https://doi.org/10.1116/6.0002640>.
32. C. Macias-Romero, M. E. P. Didier, P. Jourdain, P. Marquet, P. Magistretti, O. B. Tarun, V. Zubkovs, A. Radenovic, and S. Roke, Opt. Express **22**(25), 31102 (2014); <https://doi.org/10.1364/OE.22.031102>.
33. M. Yu. Eremchev, JETP Lett. **118**(4), 288 (2023); <https://doi.org/10.1134/S0021364023602245>.
34. D. Roesel, M. Eremchev, T. Schönfeldová, S. Lee, and S. Roke, Appl. Phys. Lett. **120**(16), 160501 (2022); <https://doi.org/10.1063/5.0085807>.
35. M. Eremchev, D. Roesel, C. S. Poojari, A. Roux, J. S. Hub, and S. Roke, Biophys. J. **122**, 624 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.01.018>.

36. D. Roesel, M. Eremchev, C. S. Poojari, J. S. Hub, and S. Roke, *J. Am. Chem. Soc.* **144**(51), 23352 (2022); <https://doi.org/10.1021/jacs.2c08543>.
37. A. Weinberger, F. C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, and C. Marques, *Biophys. J.* **105**(1), 154 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.024>.
38. G. Gonella, C. Lütgebaucks, A. G. F. de Beer, and S. Roke, *J. Phys. Chem. C* **120**(17), 9165 (2016); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b12453>.
39. M. Eisenberg, T. Gresalfi, T. Riccio, and S. McLaughlin, *Biochemistry* **18**(23), 5213 (1979); <https://doi.org/10.1021/bi00590a028>.
40. J. Faraudo, and A. Traveset, *Biophys. J.* **92**(8), 2806 (2007); <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.092015>.
41. R. Lehmann and J. Seelig, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* **1189**(1), 89 (1994); [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90284-4).
42. C. G. Sinn, M. Antonietti, and R. Dimova, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **282–283**, 410 (2006); <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.10.014>.
43. C. Lütgebaucks, C. Macias-Romero, and S. Roke, *J. Chem. Phys.* **146**(4), 044701 (2017); <https://doi.org/10.1063/1.4974084>.
44. O. B. Tarun, C. Hanneschläger, P. Pohl, and S. Roke, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**(16), 4081 (2018); <https://doi.org/10.1073/pnas.1719347115>.