

Генерация второй гармоники как неинвазивный метод исследования молекулярных процессов на поверхности липидных мембран (Миниобзор)

М. Ю. Еремчев¹⁾

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

Поступила в редакцию 18 июля 2023 г.

После переработки 19 июля 2023 г.

Принята к публикации 19 июля 2023 г.

Развитие и внедрение современных экспериментальных методов исследования в междисциплинарные проекты способствует решению фундаментальных задач в области молекулярной биологии и медицины. Одной из таких задач является понимание физики молекулярных взаимодействий, происходящих в узком слое (< 1 нм) на поверхности клеточных липидных мембран (гидратная оболочка мембраны), где происходит большинство важных электрохимических взаимодействий с ионами и протеинами, трансмембранный транспорт молекул, а также эндоцитоз. Решение данной задачи требует использования неинвазивных методов, чувствительных к изменениям молекулярной структуры поверхностного слоя мембран. Цель данного мини-обзора – осветить преимущества нелинейной оптической микроскопии и спектроскопии для изучения структурных и электростатических особенностей липидных мембран, описать разработанный метод визуализации гидратации липидных мембран, а также обсудить границы применимости данного метода.

DOI: 10.31857/S1234567823160103, EDN: iwctqz

Введение. Современные физические методы исследования, а также инструменты фотоники становятся основой для междисциплинарных исследований в биофизике [1–5]. Получение фундаментальных знаний о структурных и динамических свойствах сложных биологических систем начинается с отработки экспериментальных методов на модельных объектах [6–9]. В случае с клеточными мембранами такими модельными объектами являются везикулы, состав и окружение которых могут быть подобраны под конкретную задачу.

Липидные мембраны являются неотъемлемой частью всех живых клеток. Они выполняют широкие спектр критически важных функций, в частности, являются защитным барьером, контролируют трансмембранные концентрационные градиенты и передают электрические сигналы. Существование, а также правильное функционирование мембран неотъемлемо связано с их гидратным слоем и связанными с гидратацией поверхностными взаимодействиями.

Гидратный слой или гидратная оболочка – это тонкий слой (< 1 нм), состоящий из молекул воды, которые напрямую связаны с поверхностью мембраны посредством электростатического взаимодей-

ствия и водородных связей. В этом слое свойства и ориентация молекул воды принципиально отличаются в сравнении с молекулами вдали от поверхности. Из-за отсутствия достаточно чувствительных методов изучение данного вида молекулярных взаимодействий в гидратном слое без нарушения структуры самого слоя существенно затруднено.

Один из основных и исторически первых методов изучения электростатических свойств мембран основывается на емкостных измерениях. В этом методе плоская липидная мембрана в жидком растворе размещается между двумя электродами [10, 11]. Благодаря этому методу были получены значения электрической емкости и сопротивления мембран [12, 13]. К недостаткам данного метода необходимо отнести отсутствие пространственного разрешения и молекулярной чувствительности, что приводит к невозможности описать весь спектр процессов, происходящих в гидратном слое мембран. Большинство оптических методов исследований опирается на использование флуоресцентной микроскопии [14–16], комбинационного рассеяния света [17–20], атомно-силовую микроскопию [21], а также интерферометрию [22]. Данные методы позволили получить ценную информацию о составе и структуре мембран, формировании микро- и нанодоменов, взаимодействии с протеинами, а так-

¹⁾e-mail: maks.eremchev@gmail.com

же внутримолекулярных взаимодействиях в мембранах. Однако эти методы либо являются инвазивными, либо не обладают избирательной чувствительностью к интерфейсам, что не позволяет исследовать явления, происходящие в гидратном слое мембран.

Этот миниобзор призван осветить преимущества нелинейной оптической микроскопии и спектроскопии, в частности, генерации второй гармоники (ГВГ) и генерации суммарной гармоники (ГСГ) при изучении структурных и электростатических особенностей липидных мембран без нарушения ее целостности, а также представить последние достижения в области высокоэффективной широкопольной микроскопии ГВГ для визуализации гидратного слоя липидных мембран. Данный миниобзор начинается с обсуждения взаимодействий, происходящих в гидратной оболочке мембран, подчеркивая важность процессов, происходящих в слое толщиной < 1 нм у поверхности мембраны. Далее будет показано, как, смещая фокус на водный интерфейс и анализируя структуру гидратного слоя с помощью ГВГ микроскопии, можно получить важнейшие электрохимические параметры поверхности мембран, такие, как электростатический поверхностный потенциал, энергия и сила связи липид-ионного взаимодействия. В последней части обсуждается использование ГВГ микроскопии для исследования пассивного транспорта дивалентных ионов через липидные мембраны.

Гидратация мембран и поверхностные эффекты связанные с ионами. Роль гидратации мембраны, а также связанные с ней фундаментальные поверхностные электрохимические взаимодействия остаются без внимания в абсолютном большинстве научных исследований, так как эти поверхностные эффекты достаточно сложно изучать экспериментальными методами, не нарушая целостности молекулярной поверхности мембраны.

Рентгеновская спектроскопия и спектроскопия ядерного магнитного резонанса показали, что не менее 30-ти молекул воды в поверхностном гидратном слое мембраны непосредственно связаны с одним отрицательно заряженным липидом [23]. Это означает, что молекулы воды в количественном соотношении превосходят все другие виды молекул в поверхностном слое мембран и, следовательно, имеют большое влияние на поверхностные эффекты. Колебательная спектроскопия ГСГ показала упорядочение молекул воды вокруг липидных мембран [24]. При этом анионные липиды ориентируют диполи воды сильнее, чем цвиттер-ионные (нейтрально заряженные) липиды. В других работах было показано формирование слабых водородных связей глубоко внутри гид-

рофильной группы липидов [25, 26], которые нельзя объяснить простыми электростатическими соображениями.

Электростатические взаимодействия мембран с молекулами воды в гидратном слое становятся еще более сложными, если в системе появляются различные ионы. Такие взаимодействия могут влиять на упорядочивание липидов [27–30], вызывать частичную дегидратацию мембран [29, 31–33], способствовать слиянию и разделению мембран [34, 35], влиять на проницаемость мембран [36, 37], а также способствовать работе ионных каналов в процессах сигнализации [38–40]. Дивалентные ионы, такие как кальций или магний, взаимодействуют с анионными мембранами значительно сильнее, чем моновалентные ионы, за счет формирования ионных связей с головными группами липидов [41–43]. Такие взаимодействия приводят к нейтрализации, а в некоторых случаях даже к изменению заряда мембраны [44–46]. При этом дивалентные ионы имеют сильное воздействие не только на электростатику мембран, но и на их механические свойства. Присутствие ионов кальция на поверхности мембраны влияет на натяжение мембраны [47] и приводит к изменению формы мембраны, формированию областей с локальной отрицательной кривизной [48–50]. Некоторые работы постулировали, что отрицательно заряженные липиды могут служить в качестве хранилища ионов кальция в клеточных мембранах [15]. Взаимодействие ионов меди с анионными мембранами носит совершенно другой характер. Уже при пикомолярных концентрациях эти ионы начинают образовывать связи с головными группами липидов. Более того, при низких концентрациях взаимодействие ионов меди с мембраной не приводит к изменению заряда мембраны за счет ее депротонации [51]. Понимание эффектов, связанных с взаимодействием протонов с липидными мембранами, также является фундаментально важной задачей [52, 53].

В настоящее время не существует единой молекулярной картины, которая бы описывала эти поверхностные эффекты. Главная проблема заключается в поиске неинвазивных экспериментальных методов, способных извлекать информацию о поверхностных процессах с высоким пространственным и временным разрешением.

Поверхностная чувствительность нелинейных оптических методов. Избирательная чувствительность к интерфейсам (поверхностная “селективность”) может быть достигнута за счет использования нелинейных оптических процессов второго порядка, таких, как ГВГ и ГСГ. Правила отбора по

симметрии для таких процессов разрешают генерацию фотонов только на несимметричных структурах или молекулах в изотропной среде [54]. Более того, пространственное распределение таких молекул тоже должно быть нецентросимметричным для возникновения нелинейной поляризации (рис. 1а). Та-

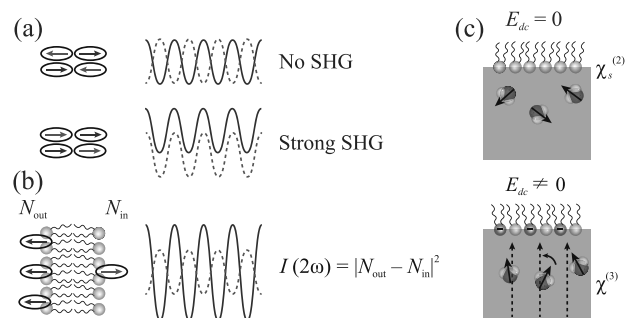


Рис. 1. (Цветной онлайн) Схематичное описание процесса ГВГ от поверхностных структур. (а) – Случайная ориентация нецентросимметричных молекул запрещает процесс генерации второй гармоники (верхняя иллюстрация). Ориентированное расположение нецентросимметричных молекул способствует появлению когерентного ГВГ сигнала (нижняя иллюстрация). (б) – ГВГ чувствительна к трансмембранной асимметрии. (с) – Поляризация молекул воды вблизи заряженной поверхности дополнительно вносит вклад в ГВГ сигнал. E_{dc} – напряженность электростатического поля, $\chi_s^{(2)}$ – поверхностная нелинейная восприимчивость второго порядка, характеризующая асимметрию поверхности, $\chi^{(3)}$ – нелинейная восприимчивость третьего порядка, характеризующая поляризацию молекул воды в присутствии электростатического поля, создаваемого поверхностью

ким образом, данные методы можно считать исключительно чувствительными к границам раздела изотропных сред или поверхностям материалов, где центросимметрия нарушена из-за несбалансированного состояния и ориентации молекул в направлении, перпендикулярном поверхности. Из этого также следует, что в случае формирования симметричной липидной мембраны (состоящей в простом случае из двух зеркально симметричных монослоев), нелинейная поляризация от каждого монослоя в мембране будет скомпенсирована такой же поляризацией, направленной противоположно. Таким образом, можно утверждать, что ГВГ и ГСГ чрезвычайно чувствительны к изменениям в симметрии липидной мембраны (рис. 1б).

Идеи использования эффекта ГВГ в качестве инструмента для изучения поверхностных электростатических феноменов мембран (мембранного потенциала, поверхностной плотности зарядов) существо-

вали уже давно [55, 56]. Однако из-за низкой эффективности нелинейного преобразования фотонов, большинство исследований по микроскопии ГВГ были сделаны с использованием резонансных усилителей, помещенных в мембрану [57–59]. В этих работах, измерение мембранного потенциала производилось с помощью так называемых потенциал-чувствительных красителей (*voltage sensitive probe*), которые демонстрируют пропорциональную зависимость сигнала ГВГ от величины поверхностного потенциала. Первые работы по микроскопии ГВГ, в котором не использовались никакие вспомогательные красители, были проведены в группе Джона Конбоя (John Conboy) [60, 61]. В этих работах изучались силы химической связи хиральных молекул и анестетика тетракаина и липидов в плоской мультикомпонентной мембране на подложке. Несмотря на то, что сами исследуемые молекулы обладали высокими молекулярными нелинейными поляризуемостями, время накопления одного изображения было крайне велико – составляло 20–30 мин из-за использования сканирующей конфокальной схемы. В других работах метод ГСГ использовался для химической визуализации дейтерированных фосфолипидных мембран и липидных монослоев [62, 63]. Однако и в этих экспериментах время накопления достигало 1 ч. Такие времена накопления не позволяют исследовать динамические процессы, происходящие на поверхности мембран. К примеру, процесс пассивного транспорта дивалентных ионов через липидную мембрану, обсуждаемый в следующей главе, занимает в среднем от 10 до 30 мин (для типичных везикул с диаметром 10 мкм) и остался бы незамеченным при использовании существующих методов ГВГ.

Контраст ГВГ/ГСГ может возникать не только за счет нарушения структурной симметрии липидных мембран, но и за счет асимметрии гидратного слоя, окружающего мембрану. Действительно, за счет электростатических взаимодействий и водородных связей, на каждую головную группу липидов приходится несколько десятков ориентированных молекул воды, непосредственно связанных с ней [23]. Поэтому интенсивность ГВГ напрямую показывает степень ориентации молекул воды на поверхности мембраны. Данное свойство справедливо для большого круга водных интерфейсов, что делает молекулы воды уникальными зондами для изучения поверхностных электрохимических свойств [64]. При этом необходимо отметить, что данный метод справедлив и для других растворителей, которые обладают молекулярной асимметрией, а значит и молекулярной поляризуемостью второго порядка.

Группа проф. Кеннета Эйзенталя (Kenneth Eisenthal) первой показала, что поляризация молекул воды поверхностным электростатическим полем вблизи границы раздела воды и кварцевого стекла вносит существенный вклад в интенсивность ГВГ от поверхности [65, 66]. Меняя pH раствора, они показали наличие постоянной составляющей в ГВГ сигнале (поверхностные молекулы кварца при pH=2), а также составляющей, зависящей от поверхностного заряда (поляризованные молекулы воды). В дальнейшем было показано, что ориентированные молекулы воды на поверхности липидных пленок также вносят существенный вклад в ГВГ, при этом интенсивность генерируемого излучения может быть представлена в следующем виде (рис. 1с) [67]:

$$I(2\omega) \propto |\chi_s^{(2)} E_1(\omega) E_2(\omega) + \chi^{(3)} E_1(\omega) E_2(\omega) \Phi_0|^2, \quad (1)$$

где $\chi_s^{(2)}$ – поверхностная нелинейная восприимчивость второго порядка, характеризующая асимметрию поверхности, $\chi^{(3)}$ – нелинейная восприимчивость третьего порядка, характеризующая поляризацию молекул воды в присутствии электростатического поля, Φ_0 – поверхностный потенциал. Из данного выражения видно, что интенсивность сигнала ГВГ пропорциональна квадрату поверхностного потенциала материала. Также было показано, что в случае положительно заряженных липидов, ориентация поверхностных молекул воды приводит к увеличению суммарной нелинейной поляризации интерфейса (а значит и сигнала ГВГ), а в случае отрицательно заряженных липидов происходит деструктивная интерференция нелинейных поляризаций, что приводит к исчезновению сигнала ГВГ (меняется знак Φ_0 в уравнении (1)).

Развитие методов ГВГ микроскопии за последние 10 лет привело к появлению отдельного направления безмаркерной высокоэффективной широкопольной микроскопии ГВГ, основной акцент в которой делается на изучение пространственно-временных электрохимических характеристик липидных мембран с размерами, соизмеримыми с клеточными (10–100 мкм) [68, 69]. В этом методе использование широкопольной засветки образца (~ 100 мкм в диаметре) фемтосекундными (< 200 фс) лазерными импульсами с частотой следования импульсов < 1 МГц, позволило увеличить эффективность ГВГ микроскопии (контраст, время накопления) на 2–3 порядка величины по сравнению со сканирующими схемами. Это позволило использовать данную методику для визуализации трансмембранной асимметрии гидратной оболочки липидной мембраны в виде сферических везикул [69, 70]. В указанных работах везикулы бы-

ли сформированы из смеси цвиттерионных DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и анионных DPhPA (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphate) липидов, осажденных на полимерной пленке из поливинилалкоголя и гидрированные раствором сахарозы. Рассмотрим этот пример подробнее. Интенсивность сигнала ГВГ в этом случае может быть представлена в следующем виде:

$$I(2\omega) \propto |\chi^{(3)} E_1(\omega) E_2(\omega) (\Phi_{0,1} - \Phi_{0,2})|^2, \quad (2)$$

где индексами “1” и “2” показаны поверхностные потенциалы каждой стороны мембраны.

На рисунке 2а показано изображение везикулы в микроскопе в белом свете. На рисунке 2б показаны ГВГ изображения экваториальных сечений той же самой везикулы в отсутствие и в присутствии CaCl_2 в растворе [70]. В данном случае асимметрия, приводящая к появлению сигнала ГВГ, возникает за счет электростатического связывания ионов кальция с отрицательно заряженными липидами на внешней оболочке мембраны, что нарушает ориентацию молекул воды у поверхности (рис. 2б, схематическая молекулярная картина). В экспериментах использовалось линейно поляризованное излучение (двойная стрелка YY на рис. 2б показывает направление поляризации лазера и сигнала ГВГ), из-за чего сигнал ГВГ имел явную зависимость от угла между направлением поляризации и нормалью к поверхности везикулы.

Попытки визуализировать липидные мембраны и измерить мембранный потенциал данным способом производились и на плоских липидных мембранах [71, 72]. В данном случае, сигнал ГВГ был значительно ниже, чем при использовании гигантских везикул. Однако преимуществом плоских мембран является возможность прикладывать напряжение сквозь липидную мембрану с помощью электродов. Исследование поведения сигнала ГВГ от мембраны в зависимости от приложенного напряжения позволило провести калибровку измеряемых на камере отсчетов от трансмембранного потенциала ($\Phi_{0,1} - \Phi_{0,2}$) [71]. Данная калибровка впоследствии использовалась для восстановления абсолютного значения трансмембранного потенциала на поверхности везикул (рис. 2б).

Как уже было отмечено, ГВГ является очень чувствительным методом получения молекулярной информации из поверхностного гидратного слоя мембран. Интенсивность сигнала напрямую характеризует степень воздействия различных ионов и молекул на структуру гидратной оболочки мембраны и позволяет проводить количественную характеристику

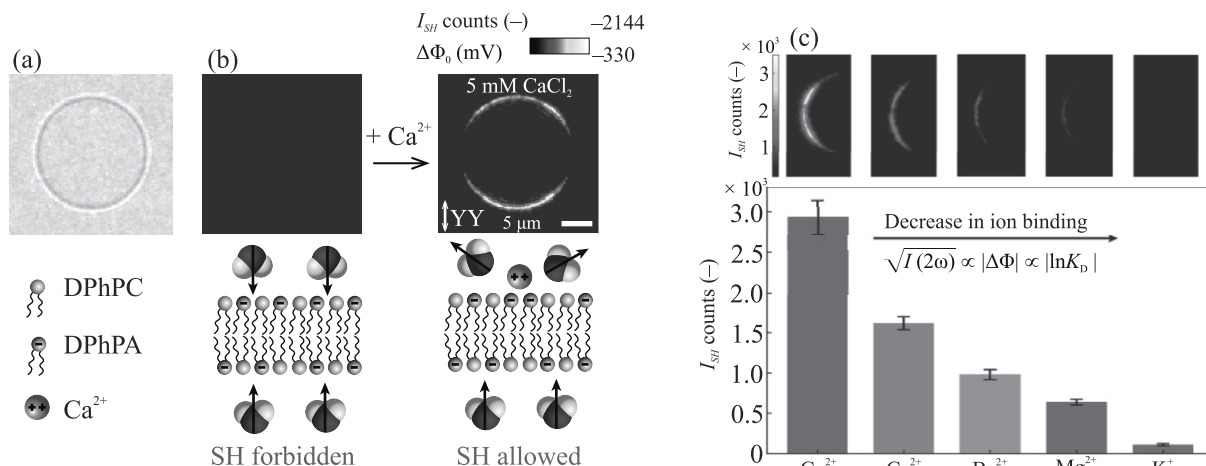


Рис. 2. (Цветной онлайн) Высокоэффективная ГВГ микроскопия для визуализации трансмембранной асимметрии гидратной оболочки. (a) – Изображение гигантской везикулы, сформированной из анионных (DPhPA) и цвиттерионных (DPhPC) в водном растворе сахарозы. (b) – Изображение данной везикулы в контрасте ГВГ до и после добавления 5 мМоль/л CaCl₂ во внешний раствор (верхняя панель). Схематическая иллюстрация молекулярной картины интерфейса (нижняя панель). (c) – Гистограмма усредненного сигнала от везикул одинакового состава (1:1 DPhPC:DPhPA), помещенных в контакт с различными солевыми растворами

силы электростатической связи между различными ионами и функциональными группами липидов. Рисунок 2с показывает гистограмму усредненного сигнала ГВГ от везикул одинакового состава в контакте с различными солями (Cu²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ и K⁺) одинаковой концентрации [73]. При этом сила связи для дивалентных ионов убывает как Cu²⁺ > Ca²⁺ > Ba²⁺ > Mg²⁺. В работе [74] было показано, как из интенсивности сигнала ГВГ можно рассчитать абсолютные значения энергии связи, а также константы диссоциации K_D ионов с липидными мембранами. Полученные экспериментальные значения энергии связи для ионов кальция находятся в диапазоне от 19 до 26 кТ, для ионов бария от 10 до 16 кТ, и для ионов магния от 5 до 8 кТ. Еще один важный результат заключается в том, что воздействие моновалентных ионов K⁺ на структуру гидратного слоя существенно слабее, чем в случае дивалентных ионов. Дивалентные ионы образуют сильные электростатические связи с функциональными группами липидов и могут проникать глубоко в мембрану, тем самым в значительной мере нарушая упорядоченную структуру гидратного слоя. Напротив, моновалентные ионы оказывают лишь экранирующее действие, что не приводит к полному разупорядочиванию молекул воды в гидратном слое.

Применение ГВГ микроскопии для исследования трансмембранного молекулярного транспорта. В работе [75] было показано, что ГВГ может быть использована как чувствительный метод изучения транспорта молекул действующих веществ

лекарственных средств через модельные, а также клеточные липидные мембраны. В данном случае сигнал ГВГ может быть представлен в следующем виде:

$$I(2\omega) \propto |N_{\text{out}}(t) - N_{\text{in}}(t)|^2, \quad (3)$$

где N_{out} и N_{in} – концентрации исследуемых молекул на внешней и внутренней поверхности мембраны (см. рис. 1b). В момент добавления данных молекул во внешний раствор с одной стороны мембраны происходит адсорбция этих молекул на поверхность, что разрушает изначальную симметрию мембраны и приводит к возникновению ГВГ сигнала. Затем, по мере диффузии данных молекул с одной стороны мембраны на другую, происходит постепенное выравнивание симметрии мембраны, что приводит к уменьшению сигнала ГВГ. Анализ эволюции сигнала ГВГ во времени позволяет получить значения проницаемости мембраны для той или иной молекулы, а также исследовать возможности ускорения или замедления трансмембранного транспорта посредством изменения внешних условий или структуры мембраны.

Похожим образом, в работах [70, 73] был обнаружен медленный транспорт дивалентных ионов через липидные мембраны, состоящие из DOPC:DOPA (1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate) липидов. Основное отличие заключается в том, что изменение сигнала ГВГ возникало не напрямую из-за наличия трансмембранного градиента ионов (ионы центросимметричные и

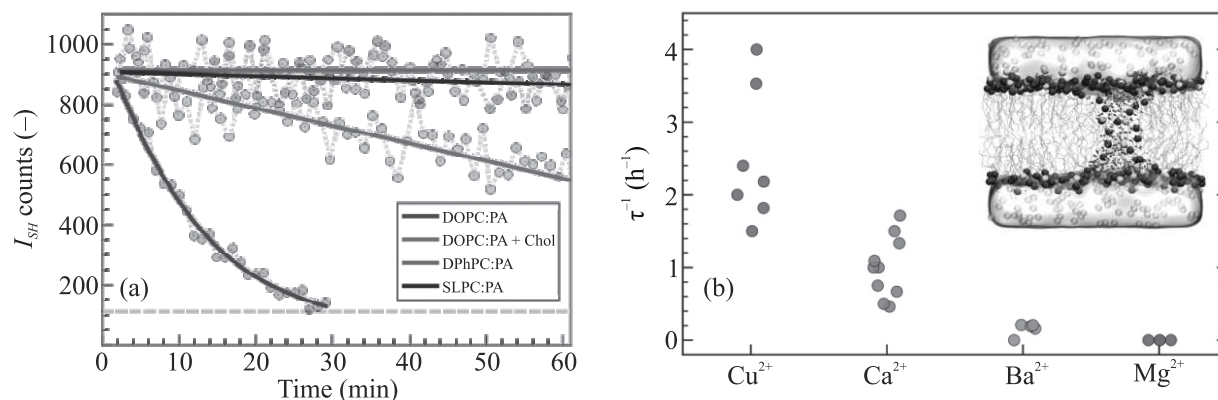


Рис. 3. (Цветной онлайн) Транспорт дивалентных ионов через липидные мембраны. (а) – Кинетика ГВГ сигнала от везикул с различной структурой гидрофобного ядра, помещенных в раствор $CaCl_2$ с концентрацией 5 мМоль/л. (б) – Время затухания ГВГ сигнала от везикул, сформированных из 1:1 DOPC:DOPA липидов и помещенных в раствор различных дивалентных солей (одинаковой концентрации 5 мМоль/л). Вставка: сформированная пора в липидной мембране

не могут являться источниками ГВГ), а из-за разупорядочивания молекул воды в гидратной оболочке мембраны прошедшими ионами. Для DOPC:DOPA липидных мембран (формирующих неплотную мембрану) данный транспорт приводил к полному исчезновению трансмембранного поверхностного потенциала (рис. 3а). При анализе кривой затухания сигнала было получено значение коэффициента проницаемости $\sim 10^{-8}$ см/с, что свидетельствует о чрезвычайно медленной скорости прохождения ионов, из-за чего данный вид транспорта не был замечен другими методами (которые в основном измеряют присутствие ионов в толще образца). Добавление молекул холестерина в такие мембраны приводило к существенному замедлению транспорта ионов. Это означает, что гидрофобное ядро мембраны (углеводородные хвосты) является основным барьером для транспорта. Было показано полное подавление данного вида транспорта через мембраны, состоящие из DPhPC:DPhPA, а также липидов с полиненасыщенными жирными кислотами наподобие Омега-3 (рис. 3а).

Для определения молекулярного механизма обнаруженного транспорта дивалентных ионов в работе [73] был проведен ряд экспериментов, в которых варьировался мембранный состав, а также ионный состав окружающего раствора. Было показано, что при одинаковых условиях (структура мембраны, состав окружающего раствора) различные дивалентные ионы (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} и Ba^{2+}) с разной скоростью проникают через мембраны, причем быстрее всего происходит транспорт ионов Cu^{2+} , в то время как ионы Mg^{2+} и вовсе не способны преодолеть гидрофобный барьер мембраны (рис. 3б). Полученные дан-

ные по транспорту ионов коррелируют с данными по электростатической силе связи соответствующих ионов с отрицательно заряженными мембранами. На основании этих данных, а также молекулярно-динамического моделирования была предложена модель транспорта дивалентных ионов через липидные мембраны. В данной модели присутствие дивалентных ионов на одной стороне мембраны приводило к возникновению трансмембранного потенциала, величина которого была достаточной для локального образования трансмембранного дефекта (поры), через которую ионы проникали на другую сторону (вставка на рис. 3б).

Закключение. Нелинейные оптические эффекты, такие как ГВГ и ГСГ, являются уникальными методами, позволяющими исследовать молекулярную структуру, гидратацию, а также электрохимическую активность липидных мембран в естественных условиях. Микроскопия ГВГ позволяет визуализировать процессы, происходящие в узком (< 1 нм) слое у поверхности мембран. Возможность оптически измерять данные электрохимические параметры позволит существенно расширить, а в некоторых случаях и перевернуть наше текущее представление о функциях мембран. В последние годы появляется все больше научных работ, в которых признается, что липидные мембраны играют значительно более сложную роль в клеточных взаимодействиях, чем предполагалось ранее. Представления о мембранах как о не изменяющемся во времени клеточном барьере не могут объяснить существующего разнообразия структурных и химических особенностей липидов в живых клетках. Даже незначительные отклонения в структуре или составе липидных мем-

бран приводят к серьезным последствиям, влияющим на важнейшие биологические функции. Более того, огромное число генетических заболеваний (в том числе болезнь Альцгеймера) связаны с нарушениями структуры клеточных мембран. Поэтому возникает необходимость разрабатывать междисциплинарные подходы для того, чтобы выявлять новые функции мембран, в частности, использования микроскопии сверхвысокого разрешения [76, 77]. Предложенный метод ГВГ микроскопии не ограничивается визуализацией процессов на поверхности модельных липидных мембран, но может применяться и для других систем, в том числе для визуализации водных поверхностей кварца [78], электродов [79], нейронов [80], а также тонких пленок, в которых присутствует нарушение симметрии [81, 82]. Дальнейшее развитие данных методов, а также применение их к новым системам позволит получить фундаментальную информацию, недоступную для других методов.

Работа поддержана грантом государственного задания Физического института им. П. Н. Лебедева РАН (AAAA-A19-119083090053-9). Автор работы входит в состав Ведущей научной школы РФ (Грант Президента НШ-776.2022.1.2).

1. Ю. С. Петронюк, Е. А. Храмцова, 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. О. В. Градов, Ю. В. Жуланов, П. Ю. Макавеев, *Фотоника* **14**(6), 542 (2020); <https://doi.org/10.22184/1993-7296.FRos.2020.14.6.542.549>.
4. E. Zavyalova, O. Ambartsumyan, G. Zhdanov, D. Gribanyov, V. Gushchin, A. Tkachuk, E. Rudakova, M. Nikiforova, N. Kuznetsova, L. Popova, B. Verdiev, A. Alatyrev, E. Burtseva, A. Ignatieva, A. Pliukhina, I. Dolzhikova, A. Arutyunyan, A. Gambaryan, V. Kukushkin, *Nanomaterials* **11**(6), 1394 (2021); <https://doi.org/10.3390/nano11061394>.
5. К. Лефорт, Р. П. О'Конор, В. Бланке, Л. Маньо, Х. Кано, В. Томбелейн, Ф. Левек, В. Кудерк, Ф. Лепру, *Фотоника* **14**(1), 88 (2020); <https://doi.org/10.22184/1993-7296.FRos.2020.14.1.88.94>.
6. Ю. А. Ермаков, В. Е. Асадчиков, Ю. О. Волков, А. Д. Нуждин, Б. С. Рошин, В. Хонкимаки, А. М. Тихонов, *Письма в ЖЭТФ* **109**(5), 340 (2019); <https://doi.org/10.1134/S0370274X19050126>.
7. А. А. Мельникова, Р. А. Камышинский, А. В. Комова, А. П. Руденко, З. Б. Намсараев, *Известия Российской академии наук, Серия Физическая* **85**(8), 1070 (2021); <https://doi.org/10.31857/S0367676521080196>.
8. Т. И. Шарипов, Р. Р. Гарафутдинов, Р. З. Бахтизин, *Известия Российской академии наук, Серия Физическая* **84**(5), 675 (2020); <https://doi.org/10.31857/S0367676520050336>.
9. 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**(12), 876 (2023); <https://doi.org/10.31857/S1234567823110125>.
10. V. B. Arakelian, D. Walther, E. Donath, *Colloid Polym. Sci.* **271**(3), 268 (1993); <https://doi.org/10.1007/BF00652367>.
11. S. McLaughlin, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**(1), 113 (1989); <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.18.060189.000553>.
12. S. H. White and W. Chang, *Biophys. J.* **36**(2), 449 (1981).
13. V. K. Miyamoto and T. E. Thompson, *J. Colloid Interface Sci.* **25**(1), 16 (1967); [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(67\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(67)90005-7).
14. T. Baumgart, G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb, and G. W. Feigenson, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* **1768**(9), 2182 (2007); <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.012>.
15. A. Melcrova, 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>.
16. Y. Li, R. Lipowsky, and R. Dimova, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**(12), 4731 (2011); <https://doi.org/10.1073/pnas.1015892108>.
17. A. A. Dmitriev and N. V. Surovtsev, *J. Phys. Chem. B* **119**(51), 15613 (2015); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b07502>.
18. 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>.
19. J.-X. Cheng and X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **108**(3), 827 (2004); <https://doi.org/10.1021/jp035693v>.
20. E. O. Potma and X. S. Xie, *ChemPhysChem* **6**(1), 77 (2005); <https://doi.org/10.1002/cphc.200400390>.
21. L. J. Johnston, *Langmuir* **23**(11), 5886 (2007); <https://doi.org/10.1021/la070108t>.
22. G. de Wit, J. S. H. Danial, P. Kukura, and M. I. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**(40), 12299 (2015); <https://doi.org/10.1073/pnas.1508483112>.
23. H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, K. Gawrisch, D. Harries, V. A. Parsegian, and J. F. Nagle, *Biophys. J.* **86**(3), 1574 (2004); [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74225-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74225-3).

24. X. Chen, W. Hua, Z. Huang, and H.C. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **132**(32), 11336 (2010); <https://doi.org/10.1021/ja1048237>.
25. M. Sovago, E. Vartiainen, and M. Bonn, *J. Chem. Phys.* **131**(16), 161107 (2009); <https://doi.org/10.1063/1.3257600>.
26. Y. Nojima, Y. Suzuki, and S. Yamaguchi, *J. Phys. Chem. C* **121**(4), 2173 (2017); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b09229>.
27. J. J. G. Casares, L. Camacho, M. T. Martin-Romero, and J. J. L. Cascales, *ChemPhysChem* **9**(17), 2538 (2008); <https://doi.org/10.1002/cphc.200800321>.
28. P. Garidel and A. Blume, *Langmuir* **15**(17), 5526 91999; <https://doi.org/10.1021/la990217a>.
29. 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).
30. U. R. Pedersen, C. Leidy, P. Westh, and G. H. Peters, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr* **1758**(5), 573 (2006); <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.035>.
31. M. Mirza, Y. Guo, K. Arnold, C. J. van Oss, and S. Ohki, *J. Dispers. Sci. Technol.* **19**(6-7), 951 (1998); <https://doi.org/10.1080/01932699808913225>.
32. R. D. Porasso and J. J. Lopez Cascales, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **73**(1), 42 (2009); <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.04.028>.
33. M. L. Valentine, A. E. Cardenas, R. Elber, and C. R. Baiz, *Biophys. J.* **115**(8), 1541 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.044>.
34. Y. Kozlovsky, L. V. Chernomordik, and M. M. Kozlov, *Biophys. J.* **83**(5), 2634 (2022); [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75274-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75274-0).
35. W.-D. Zhao, E. Hamid, W. Shin, P. J. Wen, E. S. Krystofiak, S. A. Villarreal, H.-C. Chiang, B. Kachar, and L.-G. Wu, *Nature* **534**(7608), 548 (2016); <https://doi.org/10.1038/nature18598>.
36. F. Bordi, C. Cametti, and A. Motta, *J. Phys. Chem. B* **104**(22), 5318 (2000); <https://doi.org/10.1021/jp000005i>.
37. 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>.
38. D. S. Peterka, H. Takahashi, and R. Yuste, *Neuron* **69**(1), 9 (2011); <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.010>.
39. E. Bourinet, C. Altier, M. E. Hildebrand, T. Trang, M. W. Salter, and G. W. Zamponi, *Physiol. Rev.* **94**(1), 81 (2014); <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2013>.
40. D. Smetters, A. Majewska, and R. Yuste, *Methods* **18**(2), 215 (1999); <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0774>.
41. K. Shirane, S. Kuriyama, and T. Tokimoto, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr* **769**(3), 596 (1984); [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90058-0).
42. A. Martin-Molina, C. Rodriguez-Beas, and J. Faraudo, *Biophys. J.* **102**(9), 2095 (2012); <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.009>.
43. M. Roux and M. Bloom, *Biochemistry* **29**(30), 7077 (1990); <https://doi.org/10.1021/bi00482a019>.
44. H. Hauser and M. C. Phillips, *Interactions of the Polar Groups of Phospholipid Bilayer Membranes*, in *Progress in Surface and Membrane Science*, ed. by D. A. Cadenhead and J. F. Danielli, Elsevier, Göttingen, F.R.G. (1979), v. 13, p. 297.
45. C. Newton, W. Pangborn, S. Nir, and D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr* **506**(2), 281 (1978); [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90398-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90398-X).
46. S. McLaughlin, N. Mulrine, T. Gresalfi, G. Vaio, and A. McLaughlin, *J. Gen. Physiol.* **77**(4), 445 (1981); <https://doi.org/10.1085/jgp.77.4.445>.
47. Z. T. Graber, Z. Shi, and T. Baumgart, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**(23), 15285 (2017); <https://doi.org/10.1039/C7CP00718C>.
48. M. Simunovic, K. Y. C. Lee, and P. Bassereau, *Soft Matter* **11**(25), 5030 (2015); <https://doi.org/10.1039/C5SM00104H>.
49. B. Rozycki and R. Lipowsky, *J. Chem. Phys.* **142**(5), 054101 (2015); <https://doi.org/10.1063/1.4906149>.
50. Y.-F. Chen, K.-Y. Tsang, W.-F. Chang, and Z.-A. Fan, *Soft Matter* **11**(20), 4041 (2015); <https://doi.org/10.1039/C5SM00577A>.
51. X. Cong, M. F. Poyton, A. J. Baxter, S. Pullanchery, and P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **137**(24), 7785 (2015); <https://doi.org/10.1021/jacs.5b03313>.
52. E. Weichselbaum, M. Osterbauer, D. G. Knyazev, O. V. Batishchev, S. A. Akimov, T. Hai Nguyen, C. Zhang, G. Knor, N. Agmon, P. Carloni, and P. Pohl, *Sci. Rep.* **7**(1), 4553 (2017); <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04675-9>.
53. E. Weichselbaum, T. Galimzyanov, O. V. Batishchev, S. A. Akimov, and P. Pohl, *Biomolecules* **13**(2), 352 (2023).
54. R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, 3rd ed., Academic Press, N.Y. (2008).
55. O. Bouevitch, A. Lewis, I. Pinevsky, J. P. Wuskell, and L. M. Loew, *Biophys. J.* **65**(2), 672 (1993); [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81126-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81126-3).
56. M. N. Shneider, A. A. Voronin, and A. M. Zheltikov, *Phys. Rev. E* **81**(3), 031926 (2010); <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.81.031926>.
57. T. Pons, L. Moreaux, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, and J. Mertz, *J. Biomed. Opt.* **8**(3), 428 (2023); <https://doi.org/10.1117/1.1581871>.
58. L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz, *JOSA B* **17**(10), 1685 (2000); <https://doi.org/10.1364/JOSAB.17.001685>.

59. J. Jiang, K.B. Eienthal, and R. Yuste, *Biophys. J.* **93**(5), L26 (2007); <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.111021>.
60. M.A. Kriech and J.C. Conboy, *J. Am. Chem. Soc.* **127**(9), 2834 (2005); <https://doi.org/10.1021/ja0430649>.
61. T.T. Nguyen and J.C. Conboy, *Anal. Chem.* **83**(15), 5979 (2011); <https://doi.org/10.1021/ac2009614>.
62. M. Flörsheimer, C. Brillert, and H. Fuchs, *Langmuir* **15**(17), 5437 (1999); <https://doi.org/10.1021/la9815603>.
63. K.A. Smith and J.C. Conboy, *Anal. Chem.* **84**(19), 8122 (2012); <https://doi.org/10.1021/ac301290e>.
64. D. Roesel, M. Eremchev, T. Schönfeldova, S. Lee, and S. Roke, *Appl. Phys. Lett.* **120**(16), 160501 (2022); <https://doi.org/10.1063/5.0085807>.
65. S. Ong, X. Zhao, and K.B. Eienthal, *Chem. Phys. Lett.* **191**(3), 327 (1992); [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(92\)85309-X](https://doi.org/10.1016/0009-2614(92)85309-X).
66. K.B. Eienthal, *Chem. Rev.* **96**(4), 1343 (1996); <https://doi.org/10.1021/cr9502211>.
67. L.B. Dreier, C. Bernhard, G. Gonella, E.H.G. Backus, and M. Bonn, *J. Phys. Chem. Lett.* **9**(19), 5685 (2018); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b02093>.
68. 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>.
69. M. Eremchev, D. Roesel, P.-M. Dansette, A. Michailovas, and S. Roke, *Biointerphases* **18**(3), 031202 (2023); <https://doi.org/10.1116/6.0002640>.
70. M. Eremchev, D. Roesel, C.S. Poojari, A. Roux, J.S. Hub, and S. Roke, *Biophys. J.* **S0006-3495**(23), 00034 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.01.018>.
71. 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>.
72. 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>.
73. 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>.
74. O.B. Tarun, H.I. Okur, P. Rangamani, and S. Roke, *Commun. Chem.* **3**(1), 17 (2020); <https://doi.org/10.1038/s42004-020-0263-8>.
75. Gh.M. Sharifian, *Mol. Pharm.* **18**(6), 2122 (2021); <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00009>.
76. И. Ю. Еремчев, Д. В. Прокопова, Н. Н. Лосевский, И. Т. Мынжасаров, С. П. Котова, А. В. Наумов, *Успехи физических наук* **192**(6), 663 (2022).
77. И. Ю. Еремчев, М. Ю. Еремчев, А. В. Наумов, *Успехи физических наук* **189**(3), 312 (2019); <https://doi.org/10.3367/UFNr.2018.06.038461>.
78. C. Macias-Romero, I. Nahalka, H.I. Okur, and S. Roke, *Science* **357**(6353), 784 (2017); <https://doi.org/10.1126/science.aal4346>.
79. G. Zwaschka, I. Nahalka, A. Marchioro, Y. Tong, S. Roke, and R.K. Campen, *ACS Catal.* **10**(11), 6084 (2020); <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01177>.
80. M.E.P. Didier, O.B. Tarun, P. Jourdain, P. Magistretti, and S. Roke, *Nat. Commun.* **9**(1), 5287 (2018); <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07713-w>.
81. О. В. Седельникова, Л. Г. Булушева, А. В. Окотруб, Ю. В. Першин, *Письма в ЖЭТФ* **103**(4), 269 (2016).
82. O.B. Tarun, M.Y. Eremchev, and S. Roke, *Langmuir* **34**(38), 11305 (2018); <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01790>.