

УДК 60:615.07:578.81

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-67-74>

Оригинальная статья | Original article



Долгосрочная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29: комплексная оценка *in vitro*

В.В. Авдеев , М.Б. Лапенкова , М.А. Владимирский 

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Достоевского, д. 4, корп. 1,
Москва, 127473, Российская Федерация

✉ Авдеев Вадим Вадимович; vadim.avdeev@rambler.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Распространение устойчивых к антибиотикам микобактерий создает потребность в новых терапевтических подходах лечения туберкулеза, одним из которых является фаготерапия. Использование липосомальных форм микобактериофагов рассматривается как способ повышения их эффективности, однако для дальнейшего применения таких препаратов необходима комплексная оценка их стабильности.

ЦЕЛЬ. Оценить долгосрочную (6 мес.) стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 в условиях хранения при 4 °С по комплексу физико-химических и функциональных показателей для обоснования ее дальнейшего доклинического изучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 оценивали в условиях хранения в течение 6 мес. при температуре 4 °С. Отбор проб проводили в следующие временные точки: 0; 1,5; 3; 4,5 и 6 мес. Степень инкапсуляции (%) фага определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Поверхностный заряд (дзета-потенциал) измеряли методом электрофоретического рассеяния света (доплеровской электрофоретической подвижности). Морфологию липосом анализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Функциональную активность оценивали по литической активности методом титрования по Грациа с использованием *Mycobacterium smegmatis* mc² 155.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Продемонстрирована высокая стабильность липосомальной формы фага D29. Литическая активность сохранялась на уровне ~10⁹ БОЕ/мл в течение срока хранения (6 мес., 4 °С). Степень инкапсуляции снизилась незначительно и составила >88% от исходного значения. Постоянство значения дзета-потенциала (от -6,1±0,3 до -8,2±0,5 мВ) указывает на коллоидную стабильность суспензии без агрегации частиц в течение срока хранения.

ВЫВОДЫ. Установлена высокая физико-химическая и функциональная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 при длительном хранении (6 мес., 4 °С) с сохранением литической активности и высокой степени инкапсуляции. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейшего доклинического и клинического изучения разработанной липосомальной формы для терапии микобактериальных инфекций.

Ключевые слова: микобактериофаг D29; липосомы; стабильность препарата; инкапсуляция; дзета-потенциал; просвечивающая электронная микроскопия; длительное хранение; литическая активность

Для цитирования: Авдеев В.В., Лапенкова М.Б., Владимирский М.А. Долгосрочная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29: комплексная оценка *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):67–74. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-67-74>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, регистрационный № НИОТКР 121031600067-1 «Разработка нового противотуберкулезного лекарственного препарата на основе липосомальной формы микобактериофага D29 для лечения туберкулеза легких, в том числе лекарственно устойчивых форм».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© В.В. Авдеев, М.Б. Лапенкова, М.А. Владимирский, 2026
Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Long-term stability of liposomal mycobacteriophage D29: A comprehensive *in vitro* assessment

Vadim V. Avdeev[✉] , Marina B. Lapenkova , Mikhail A. Vladimirovsky 

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4/1 Dostoevsky St., Moscow 127473, Russian Federation

✉ Vadim V. Avdeev; vadim.avdeev@rambler.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The spread of antibiotic-resistant mycobacteria necessitates new therapeutic approaches for tuberculosis, phage therapy being one of them. Liposomal mycobacteriophages are considered to be a way to enhance their efficacy; however, a comprehensive assessment of their stability is warranted for the further use of such preparations.

AIM. This study aimed to evaluate the long-term stability (over six months) of a liposomal form of mycobacteriophage D29 under storage conditions at 4 °C based on a set of physicochemical and functional parameters to substantiate its further preclinical study.

MATERIALS AND METHODS. The stability of liposomal form D29 was assessed over six months of storage at 4 °C. Sampling was performed at the following time points: 0; 1.5; 3; 4.5; and 6 months. The degree of phage encapsulation (%) was quantified by real-time polymerase chain reaction (qPCR). The surface charge (zeta potential) was measured by electrophoretic light scattering (Doppler electrophoretic mobility). Liposome morphology was analyzed using transmission electron microscopy. Functional activity was assessed by determining lytic activity via the Grazia titration method on *M. smegmatis* mc² 155 culture.

RESULTS. High stability of the liposomal phage D29 form was demonstrated. Lytic activity remained at a level of ~10⁹ PFU/mL throughout the storage period (six months, 4 °C). The degree of encapsulation decreased insignificantly (>88% of the initial value). The constant zeta potential value (from -6.1±0.3 to -8.2±0.5 mV) confirmed colloidal stability of the suspension without particle aggregation throughout the entire storage period.

CONCLUSIONS. The liposomal mycobacteriophage D29 demonstrates high physicochemical and functional stability after long-term storage (six months, 4 °C), with preserved lytic activity and a high degree of encapsulation. The findings substantiate the prospects for further preclinical and subsequent clinical trial of this preparation designed to treat mycobacterial infections.

Keywords: mycobacteriophage D29; liposomes; drug stability; encapsulation; zeta potential; transmission electron microscopy; long-term storage; lytic activity

For citation: Avdeev V.V., Lapenkova M.B., Vladimirovsky M.A. Long-term stability of liposomal mycobacteriophage D29: A comprehensive *in vitro* assessment. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):67–74. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-67-74>

Funding. The work was carried out as part of the state assignment of the National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, registration No. NIOTKR 121031600067-1 Development of a New Anti-Tuberculosis Drug Based on the Liposomal Mycobacteriophage D29 for the Treatment of Pulmonary Tuberculosis, Including Drug-Resistant Forms.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез, вызываемый *Mycobacterium tuberculosis*, остается одной из основных причин смертности от инфекционных болезней в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2022 г. было зарегистрировано более 10 млн новых случаев заболевания, а число летальных исходов составило около 1,3 млн¹. Лечение осложняется ростом числа случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью

и широкой лекарственной устойчивостью [1, 2], а также тяжелыми инфекциями, вызванными нетуберкулезными микобактериями, такими как *M. avium* complex и *M. abscessus* complex, у иммунокомпрометированных пациентов [3].

Антибиотикотерапия микобактериальных инфекций сопряжена с рядом ограничений, к которым относятся длительность курса лечения (6–24 мес.), высокая токсичность препаратов и формирование лекарственной устойчивости [4, 5],

¹ Global tuberculosis report 2023. Geneva: WHO; 2023.

что стимулирует поиск альтернативных методов лечения, таких как фаготерапия [6].

Интерес к медицинскому применению бактериофагов (фаготерапия), снизившийся в эру антибиотиков, возрождается в условиях кризиса антибиотикорезистентности [7, 8]. В частности, микобактериофаг D29 обладает литической активностью в отношении широкого спектра микобактерий, включая патогенные *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, а также нетуберкулезные *M. smegmatis* и др. [9]. Преимуществами фага D29 являются высокая специфичность к микобактериям, способность лизировать как быстро-, так и медленно растущие штаммы, а также низкая токсичность для эукариотических клеток [10]. Однако применение свободных фагов в клинической практике ограничивается их низкой стабильностью при хранении [11]. Инкапсуляция фагов в липосомы позволяет защитить вирусные частицы от деградации и воздействия факторов внешней среды (рН, ферменты, иммунная система), а также обеспечить контролируемое высвобождение [12, 13]. Липосомальные системы доставки увеличивают время циркуляции фагов в организме [14] и повышают эффективность доставки в очаг инфекции [15], в том числе ингаляционным путем [16]. В то же время исследования липосомальных форм микобактериофагов, в частности данные об их долгосрочной стабильности, остаются ограниченными [17, 18].

Цель работы – оценить долгосрочную (6 мес.) стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 в условиях хранения при 4 °С по комплексу физико-химических и функциональных показателей для обоснования ее дальнейшего доклинического изучения.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработать методику получения и контроля качества липосомальной формы микобактериофага D29;
- оценить изменение литической активности инкапсулированного фага в течение 6 мес. хранения при температуре 4 °С;
- определить динамику степени инкапсуляции фага методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ);
- исследовать коллоидную стабильность (дзета-потенциал) и морфологию липосом с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение микобактериофага D29

Микобактериофаг D29 размножали в культуре *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, которую выращивали на плотной питательной среде

Миддлбрука 7H10 (HiMedia, Индия). Суспензию *M. smegmatis* mc² 155 культивировали в 50 мл жидкой питательной среды Миддлбрука 7H9 (HiMedia, Индия), содержащей 1 мМ CaCl₂, до достижения оптической плотности 1,0. Инкубацию проводили в течение 1 сут при перемешивании (70 об/мин, 37 °С), затем добавляли 5 мл микобактериофага D29 с титром 10⁷–10⁸ бляшкообразующих единиц в 1 мл (БОЕ/мл) для обеспечения множественности заражения, близкой к 0,1, для оптимизации выхода зрелых фаговых частиц. После дополнительной суточной инкубации в тех же условиях суспензию центрифугировали (3000 об/мин, 15 мин) и фильтровали супернатант через стерильный мембранный фильтр 0,22 мкм (Merck Millipore, США).

Титр фага определяли методом серийных десятикратных разведений. Готовили серию последовательных десятикратных разведений очищенного фагового препарата в стерильном фаговом буферном растворе (0,01 М Tris-HCl, 5 мМ MgSO₄, 0,1 М NaCl, рН 7,5). Аликвоту каждого разведения (100 мкл) наносили на поверхность плотной агаризованной питательной среды 7H10 в чашках Петри, предварительно засеянных плотным газоном *M. smegmatis* mc² 155. После адсорбции фага при комнатной температуре в течение 20 мин чашки инкубировали при 37 °С 24 ч до появления четких зон лизиса (бляшек). Подсчет бляшек проводили в тех разведениях, в которых их количество составляло от 5 до 100 на чашку. Титр фага (БОЕ/мл) рассчитывали по формуле (1):

$$\text{Титр} = (N \times D) / V, \quad (1)$$

где N – среднее количество бляшек в разведении, D – коэффициент разведения, V – объем пробы, внесенной на чашку (0,1 мл). Для последующей инкапсуляции использовали препараты с титром не менее 1×10⁹ БОЕ/мл. Данный критерий был установлен для обеспечения высокой стартовой нагрузки фага в липосомы.

Хроматографическая очистка микобактериофага D29

Микобактериофаг D29, полученный в культуре *M. smegmatis* mc² 155, очищали от компонентов лизата микобактерий, содержащего смесь липаз, протеаз и разрушенных молекул ДНК, с помощью анионообменной хроматографии на сорбенте Sepromax (Galak, Китай) на хроматографе BioLogic LP (BioRad, США). Препарат микобактериофага D29 наносили на колонку, предварительно уравновешенную фаговым буферным раствором (0,01 М Tris-HCl, 5 мМ MgSO₄, 0,1 М NaCl, рН 7,5). После сбора фракций первого пика увеличивали молярность раствора до 1 М NaCl и собирали фракции второго

пика, содержащие фаговые частицы. Препарат дилизовали против фагового буферного раствора в течение 1 сут на магнитной мешалке RCT Basic IKA MAG (IKA, Германия) (110 об/мин, 4 °С) и стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм).

Получение липосом с включением микобактериофага D29 методом экструзии

Липидную пленку формировали из смеси 30 мг фосфатидилхолина (Sigma-Aldrich, США) и 10 мг холестерина (Sigma-Aldrich, США) путем растворения компонентов в 3 мл 95% этанола и высушивания на роторном испарителе (RV 3 V-C, IKA Германия). Далее липидную пленку ресуспендировали в 3 мл очищенного препарата микобактериофага D29 путем встряхивания колбы с компонентами в течение 5 мин. Полученные многослойные липосомы последовательно экстрагировали через фильтры с помощью стерильного шприца для получения однослойных липосом: однократно через фильтр 5 мкм (Merck Millipore, США), затем 19 раз через фильтр 0,45 мкм (Merck Millipore, США) и дополнительно однократно через новый фильтр 0,45 мкм.

Оценка стабильности липосомальной формы микобактериофага D29

Стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 исследовали в течение 6 мес. при температуре хранения 4 °С с использованием следующих методов.

Определение литической активности по Грациа.

Данный метод является стандартом оценки активности фагов [19]. В основе метода лежит подсчет БОЕ на *M. smegmatis* 10^8 методом серийных разведений, что позволяет оценить сохранение литической способности фага после инкапсуляции и в процессе хранения. Для проведения исследования образец липосомальной суспензии предварительно обрабатывали 1% раствором тритона X-100 (Servicebio, Китай) в течение 10 мин при комнатной температуре для полного разрушения липидных мембран и высвобождения инкапсулированных фаговых частиц. Далее проводили серийные десятикратные разведения и определяли титр БОЕ на газоне *M. smegmatis* 10^8 на плотной питательной среде 7H10. После адсорбции и инкубации при 37 °С в течение 24 ч проводили подсчет бляшек.

Степень инкапсуляции фага (%) характеризует эффективность включения вирусных частиц в липосомальные везикулы. После центрифугирования липосом при 14000 об/мин (Minispin, Eppendorf, Германия) проводили определение доли инкапсулированных фагов с помощью ПЦР-РВ [20]. Для амплификации использовали праймеры (НПК «Синтол», Россия): D29-F (5'-agccgatcagaagcagggc-3') и D29-R (5'-agcggctcttaggagggcc-3'),

а также флуоресцентный ДНК-зонд Pb_D29_up_FAM (5'-(FAM)-agccsagaactccgaccsaccg-(RTQ1)-3'). Амплификацию проводили с использованием прибора CFX96 (Bio-Rad, США). Состав реакционной смеси (25 мкл): 5 мкл образца ДНК, 1× ПЦР-буфер (500 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,8), 2,5 мМ MgCl₂, смесь dNTP (по 250 мкМ каждого), 3 пмоль ДНК-зонда Pb_D29_up_FAM, 5 пмоль каждого праймера (D29-F и D29-R) и 2,5 ед. Taq-полимеразы. Протокол амплификации: начальная денатурация при 95 °С в течение 2 мин, далее 40 циклов: 15 с – 95 °С (денатурация), 40 с – 63 °С (отжиг и элонгация).

Степень инкапсуляции (E, %) микобактериофага в липосомах рассчитывали по формуле (2):

$$E = \left(\left(2^{(Ct_{\text{общий}} - Ct_{\text{осадок}})} \times V_{\text{осадок}} \right) / V_{\text{общий}} \right) \times 100\%, \quad (2)$$

где $Ct_{\text{общий}}$ – пороговый цикл для исходного препарата, $Ct_{\text{осадок}}$ – пороговый цикл для осадка, $V_{\text{осадок}}$ – объем осадка, $V_{\text{общий}}$ – объем препарата.

Дзета-потенциал липосомальных препаратов измеряли методом лазерной доплеровской электрофоретической подвижности с использованием анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания). Данный показатель свидетельствует о коллоидной стабильности и отсутствии агрегации частиц [21].

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) позволяет визуализировать морфологию бактериофагов и липосом, оценить их размеры и целостность, а также выявить возможные структурные изменения липосомальных везикул (агрегация, фрагментация или деформация мембраны) при хранении [22]. Образцы липосомальной суспензии готовили методом отрицательного контрастирования с использованием 2% водного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (pH 7,0). Каплю препарата наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, инкубировали в течение 1 мин, после чего удаляли избыток жидкости фильтровальной бумагой и наносили контрастирующий раствор на 30 с. Избыток красителя удаляли и сетки высушивали на воздухе. Образцы визуализировали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400Plus (JEOL, Япония) с цифровой камерой Gatan Rio (Gatan, США) в режиме светлого поля при ускоряющем напряжении 60–80 кВ.

Параметры контроля стабильности липосомальной формы микобактериофага D29 представлены в *таблице 1*.

Дизайн исследования

Исследование включало три последовательных этапа. На первом этапе готовили очищенный препарат микобактериофага D29 (объем 15 мл). Препарат хранили при температуре 4 °С

Таблица 1. Параметры контроля стабильности липосомальной формы микобактериофага D29**Table 1.** Parameters for monitoring stability of the liposomal mycobacteriophage D29

Параметр <i>Parameter</i>	Критерий стабильности <i>Stability criterion</i>
Активность по Грациа <i>Grazia method</i>	Сохранение титра на уровне 10^8 – 10^9 БОЕ/мл <i>Keeping the titer at 10^8–10^9 PFU/mL</i>
Степень инкапсуляции, % <i>Encapsulation efficiency, %</i>	Снижение эффективности инкапсуляции не более чем на 15% от исходного значения <i>Loss of encapsulation degree is no more than 15%</i>
Дзета-потенциал, мВ <i>Zeta potential, mV</i>	Изменение значения не более чем на 15% от исходного значения <i>Zeta potential change no more than 15% of the initial value</i>
Морфология (ПЭМ) <i>Morphology (TEM)</i>	Наличие инкапсулированных фагов в липосомах в ≥ 5 полях зрения <i>Presence of encapsulated phages in liposomes in 5 fields of vision</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. БОЕ – бляшкообразующие единицы; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

Note. PFU, plaque-forming units; TEM, transmission electron microscopy.

не более 14 сут до дальнейшего использования. За 24 ч до начала второго этапа оценивали литическую активность препарата методом титрования по Грациа. В случае если титр фага определялся в диапазоне 10^8 – 10^9 БОЕ/мл, переходили к следующему этапу. Данная временная точка была обозначена как «точка 0».

Таблица 2. Характеристики липосомальной формы микобактериофага D29 в течение 6 мес. хранения при температуре 4 °C

Параметр <i>Parameter</i>	Показатель / <i>Value</i>				
	0 мес. / <i>0 months</i>	1,5 мес. / <i>1.5 months</i>	3 мес. / <i>3 months</i>	4,5 мес. / <i>4.5 months</i>	6 мес. / <i>6 months</i>
Литическая активность, БОЕ/мл <i>Phage activity, PFU/mL</i>	$(1,02 \pm 0,09) \times 10^9$	$(1,05 \pm 0,11) \times 10^9$	$(0,98 \pm 0,08) \times 10^9$	$(0,95 \pm 0,12) \times 10^9$	$(7,2 \pm 0,4) \times 10^8$
Степень инкапсуляции, % <i>Encapsulation efficiency, %</i>	34,1 \pm 1,5	33,7 \pm 1,7	32,3 \pm 1,9	31,4 \pm 2,1	30,2 \pm 1,8
Дзета-потенциал, мВ <i>Zeta potential, mV</i>	-6,0 \pm 0,3	-6,0 \pm 0,3	-8,0 \pm 0,6	-8,0 \pm 0,5	-8,0 \pm 0,5
Морфология (ПЭМ) <i>Morphology (TEM)</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом не изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure remains unchanged</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом не изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure remains unchanged</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом не изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure remains unchanged</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом частично изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure partially altered</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом частично изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure partially altered</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. БОЕ – бляшкообразующие единицы; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

Note. PFU, plaque-forming units; TEM, transmission electron microscopy.

На втором этапе получали липосомальную форму микобактериофага методом экструзии. После приготовления препарата отбирали пробы для комплексного анализа: определения литической активности методом Грациа (100 мкл), оценки степени инкапсуляции (2 пробы по 100 мкл), измерения дзета-потенциала (100 мкл) и ПЭМ (200 мкл). Все пробы хранили при 4 °C не более 7 сут.

На третьем этапе исследовали стабильность препарата в процессе хранения. Пробы отбирали через 1,5; 3; 4,5 и 6 мес. Объемы проб, условия анализа и температурный режим (4 °C) были идентичны таковым для исходного образца (точка 0). Для всех образцов определяли литическую активность, степень инкапсуляции, дзета-потенциал и морфологию липосом.

Все количественные измерения проводили в трех повторностях для каждой временной точки. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование стабильности липосомальной формы микобактериофага D29 в течение 6 мес. хранения при температуре 4 °C продемонстрировало высокую стабильность липосом (табл. 2). Литическая активность липосом сохранялась на исходном уровне значений ($\sim 10^9$ БОЕ/мл) в течение 4,5 мес. с незначительным снижением до $(7,2 \pm 0,4) \times 10^8$ БОЕ/мл к 6 мес. Степень инкапсуляции фага также оставалась стабильной, незначительно снизившись с $34,1 \pm 1,5$ до $30,2 \pm 1,8\%$

за 6 мес., что соответствует установленному критерию (потери <15%).

Показатель дзета-потенциала сохранял стабильные значения (от $-6,1 \pm 0,3$ до $-8,2 \pm 0,5$ мВ) на протяжении всего срока хранения, что свидетельствует об отсутствии агрегации частиц и коллоидной стабильности суспензии.

Данные ПЭМ-микроскопии (рис. 1) подтвердили сохранение липосомальных везикул во всех временных точках. После 4,5 и 6 мес. хранения у части везикул отмечена измененная морфология (деформация, нарушение сферической формы), что может быть связано с частичной дестабилизацией липидной мембраны [23]. Важно, что эти изменения не привели к значительному снижению функциональной активности или степени инкапсуляции.

Сохранение литической активности в пределах одного порядка величины свидетельствует о стабильности разработанной липосомальной формы в данных условиях хранения и сохранении способности к специфическому взаимодействию с клетками-мишенями. Эти данные согласуются с результатами исследований других липосомальных фаговых препаратов, демонстрирующих сохранение активности фагов при длительном хранении [13], что является

ключевым требованием для разработки и клинического применения лекарственных форм.

Относительно незначительное изменение степени инкапсуляции микобактериофага D29 в липосомах после 6 мес. хранения (более 88% от исходной степени инкапсуляции) свидетельствует об отсутствии существенной деградации липидных мембран и сохранении целостности липосомальных везикул. Представленные результаты коррелируют с данными о высокой стабильности липосом на основе фосфатидилхолина и холестерина при хранении, которая обеспечивается низкой проницаемостью и жесткостью бислоя, что препятствует деградации инкапсулированных агентов [23]. Метод ПЦР-РВ продемонстрировал свою эффективность для точного количественного определения доли инкапсулированных фаговых частиц, что ранее было показано в работе S. Cinquerrui с соавт. [20].

Постоянство дзета-потенциала указывает на отсутствие агрегации липосомальных частиц и сохранение коллоидной стабильности системы, что предотвращает флокуляцию, седиментацию и обеспечивает равномерное распределение частиц в суспензии. Эти результаты согласуются с данными о коллоидной стабильности липосом, описанными M. Immordino с соавт. [24].

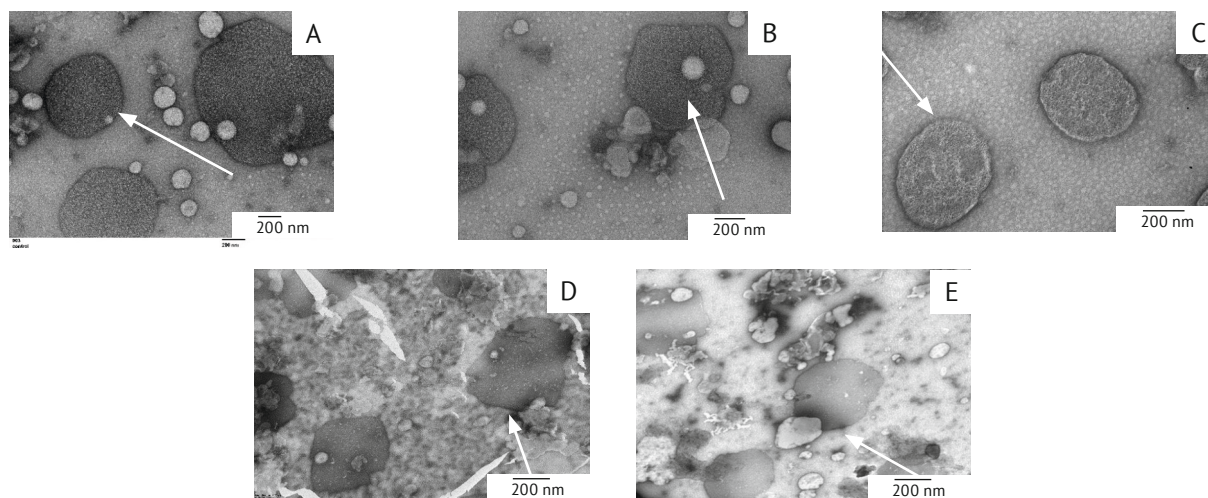


Рис. 1. Просвечивающая электронная микроскопия липосомальной формы микобактериофага D29. А – исходное состояние липосом (точка 0): липосомы сферической формы, мембрана четко выражена; В – липосомы после 1,5 мес. хранения: сохранена исходная морфология, визуализируются везикулы; С – липосомы после 3 мес. хранения: сохранена исходная морфология, визуализируются везикулы; D – липосомы после 4,5 мес. хранения: частичное изменение морфологии липосом (по сравнению с А, В, С) и мембраны; E – липосомы после 6 мес. хранения: частичное изменение морфологии липосом (по сравнению с А, В, С) и мембраны. Стрелками отмечены липосомы с инкапсулированными частицами микобактериофага. Диаметр липосом: 0,3–0,45 мкм. Масштаб шкалы: 200 нм.

Fig. 1. Transmission electron microscopy (TEM) of the liposomal mycobacteriophage D29. A, initial state of liposomes (point 0); liposomes have a spherical shape, the membrane is clearly visible. B, liposomes stored for 1.5 months, the original morphology of the liposomes is preserved, the vesicles (liposomes) are visible. C, liposomes stored for 3 months, the original morphology of the liposomes is maintained, vesicles are visible. D, liposomes stored for 4.5 months, a partial change in liposome morphology (compared to A, B, C) and membrane. E, liposomes stored for 6 months, a partial change in liposome morphology (compared to A, B, C) and membrane. Arrows point to liposomes with encapsulated mycobacteriophage particles. Liposome diameter: 0.3–0.45 μm . Scale bar: 200 nm.

Таким образом, липосомальная форма микобактериофага D29 продемонстрировала высокую стабильность по уровню литической активности, степени инкапсуляции, дзета-потенциалу после 6 мес. хранения при температуре 4 °С, что удовлетворяет установленным критериям стабильности для препаратов длительного хранения.

Настоящее исследование имеет ряд ограничений. Оценка стабильности проводилась только в условиях фиксированной температуры (4 °С), что не позволяет экстраполировать полученные данные на иные температурные режимы хранения или транспортировки. Кроме того, использованная модель *in vitro* не учитывает влияние биологических жидкостей и ферментов макроорганизма на целостность липосомальной мембраны. Дальнейшие этапы работы предусматривают оценку стабильности разработанной лекарственной формы в условиях, моделирующих температурные колебания, а также изучение кинетики высвобождения фага *in vitro* в средах,

имитирующих бронхоальвеолярный лаваж, и *ex vivo* на изолированных макрофагах.

ВЫВОДЫ

1. Установлена высокая функциональная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 при хранении в течение 6 мес. при температуре 4 °С, которая характеризуется сохранением литической активности на уровне ~10⁹ БОЕ/мл.
2. Показана высокая физико-химическая стабильность препарата: сохранение степени инкапсуляции фага (>88% от исходной) и постоянство дзета-потенциала, что свидетельствует о целостности липосом и коллоидной стабильности суспензии без агрегации частиц.
3. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейшего доклинического и клинического изучения разработанной липосомальной формы в качестве препарата для терапии микобактериальных инфекций.

Литература/References

1. Dean AS, Tosas Auguet O, Glaziou P, et al. 25 years of surveillance of drug-resistant tuberculosis: achievements, challenges, and way forward. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(7):e191–6. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00808-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00808-2)
2. Стерликов СА, Васильева ИА, Михайлова ЮВ и др. Новое определение и эпидемиология туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза в 2020 году. *Туберкулез и болезни легких*. 2023;101(2):14–9. Sterlikov SA, Vasilyeva IA, Mikhaylova YuV, et al. The new definition and epidemiology of extensive drug resistant tuberculosis in 2020. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2023;101(2):14–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-2-14-19>
3. Васильева ИА, Панова АЕ, Тинькова ВВ и др. Антибиотикорезистентность *Mycobacterium avium* в период пандемии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2024;26(4):462–9. Vasilyeva IA, Panova AE, Tinkova VV, et al. Antimicrobial resistance of *Mycobacterium avium* during the COVID-19 pandemic. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2024;26(4):462–9. <https://doi.org/10.36488/cmacc.2024.4.462-469>
4. Можокина ГН, Зюзя ЮР, Петрова ЛЮ и др. Токсичность схем терапии лекарственно устойчивого туберкулеза. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021;66(11–12):25–30. Mozhokina GN, Zyuzya YuR, Petrova LYu, et al. Toxicity of treatment regimens for drug-resistant tuberculosis. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2021;66(11–12):25–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-25-30>
5. Абрамченко АВ, Романова МИ, Гайда АИ и др. Эффективность и безопасность коротких режимов химиотерапии лекарственно-устойчивого туберкулеза: обзор литературы и метаанализ. *Туберкулез и болезни легких*. 2025;103(2):26–37. Abramchenko AV, Romanova MI, Gayda AI, et al. Effectiveness and safety of short-course chemotherapy regimens for drug-resistant tuberculosis: Literature review and meta-analysis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2025;103(2):26–37 (In Russ.). <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2025-103-2-26-37>
6. Васильева ИА. Достижения и перспективы инновационных исследований в области фтизиатрии. *Вестник Российской академии наук*. 2025;(1):63–74. Vasilyeva IA. Achievements and prospects of innovative research in the field of phthisiology. *Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2025;(1):63–74 (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S3034520025010063>
7. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011;1(2):66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
8. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017;8(3):162–73. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
9. Jacobs-Sera D, Hatfull GF. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology*. 2012;434(2):187–201. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.026>
10. Pope WH, Bowman CA, Russell DA, et al. Expanding the diversity of mycobacteriophages: insights into genome architecture and evolution. *PLoS One*. 2011;6(1):e16329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016329>
11. Flint R, Laucirica DR, Chan HK, et al. Stability considerations for bacteriophages in liquid formulations designed for nebulization. *Cells*. 2023;12(16):2057. <https://doi.org/10.3390/cells12162057>
12. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
13. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, et al. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(14):4841–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-15>

14. Kumar A, Arun JK, Matta Y, et al. Optimization of nano-liposome formulations for targeted delivery of hydrophobic drugs. *Front Health Inform.* 2024;13(7):745–57.
15. Sawant RR, Torchilin VP. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS J.* 2012;14(2):303–15. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9330-0>
16. Leung SSY, Parumasivam T, Gao FG, et al. Production of inhalation phage powders using spray freeze drying and spray drying techniques for treatment of respiratory infections. *Pharm Res.* 2016;33(6):1486–96. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1892-6>
17. Avdeev VV, Kuzin VV, Vladimirovsky MA, Vasilieva IA. Experimental studies of the liposomal form of lytic mycobacteriophage D29 for the treatment of tuberculosis infection. *Microorganisms.* 2023;11(5):1214. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051214>
18. Avdeev VV, Vladimirovsky MA, SamoiloVA AG, Vasilieva IA. Therapeutic efficacy against a drug-resistant strain of *M. tuberculosis* in an experimental study on inbred mice and associated toxicity evaluation. *Phage (New Rochelle).* 2025;6(2). <https://doi.org/10.1089/phage.2024.0066>
19. Šimoliūnas E, Vilkaitytė M, Kaliniene L, et al. Incomplete LPS Core-Specific Felix01-Like Virus vB_EcoM_VpaE1. *Viruses.* 2015;7(12):6163–81. <https://doi.org/10.3390/v7122932>
20. Cinquerrui S, Mancuso F, Vladisavljević GT, et al. Nanoencapsulation of bacteriophages in liposomes prepared using microfluidic hydrodynamic flow focusing. *Front Microbiol.* 2018;9:2172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02172>
21. Biltonen RL, Lichtenberg D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chem Phys Lipids.* 1993;64(1–3):129–42. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90062-8)
22. Steven AC. Visualization of virus structure in three dimensions. *Methods Cell Biol.* 1981;22:297–323. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61881-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61881-6)
23. Cullis PR, Hope MJ. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol Ther.* 2017;25(7):1467–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.013>
24. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):297–315. PMID: [17717971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17717971/)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.В. Авдеев** – проведение экспериментальных работ (электронная микроскопия, анализ стабильности); валидация методик; анализ данных; участие в интерпретации результатов исследования; оформление иллюстративного материала; критический анализ и доработка текста рукописи; **М.Б. Лапенкова** – разработка и оптимизация методик исследования; проведение экспериментальных работ (приготовление липосомальных форм, определение титра фагов, ПЦР-РВ, измерение дзета-потенциала, хранение образцов); статистическая обработка; визуализация результатов; написание и редактирование текста рукописи; **М.А. Владимирский** – концепция и координация исследования; формулирование целей и задач; разработка методологии исследования; интерпретация полученных данных; написание, критический анализ и доработка текста рукописи; утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows: **V.V. Avdeev** performed the experiments (electron microscopy, stability analysis of suspensions), validated the techniques, analyzed the data, participated in the interpretation of research results, designed illustrative material, critically analyzed and revised the manuscript; **M.B. Lapenkova** developed and optimized research methods, performed the experiments (preparation of liposomal forms, phage titer test, qPCR, zeta potential measurement, sample storage), processed statistical data, visualized the results, drafted and edited the manuscript; **M.A. Vladimirovsky** conceptualized and coordinated the research, formulated the aim and objectives, developed research methodology, interpreted the data obtained, drafted, analyzed and revised the manuscript, and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Авдеев Вадим Вадимович / Vadim V. Avdeev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4769-5933>

Лапенкова Марина Борисовна, канд. мед. наук / **Marina B. Lapenkova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8936-4334>

Владимирский Михаил Александрович, д-р мед. наук, проф. / **Mikhail A. Vladimirovsky**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2724-5791>

Поступила 04.08.2025

После доработки 05.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received August 4, 2025

Revised February 5, 2026

Accepted March 13, 2026