

УДК 579.66:57.042:579.0:579.222.3:60

## ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ЧИННИКІВ НА ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ

Калініченко С.В.<sup>1</sup>, Бабич Є.М.<sup>1</sup>, Ківва Ф.В.<sup>2</sup>,  
Рябовіл О.В.<sup>3</sup>, Горбунов Л.В.<sup>4</sup>, Рижкова Т.А.<sup>1</sup>,  
Скляр Н.І.<sup>1</sup>, Коваленко О.І.<sup>2</sup>, Катріч В.О.<sup>5</sup>,  
Ждамарова Л.А.<sup>1</sup>, Бобирева І.В.<sup>1</sup>, Антушева Т.І.<sup>1</sup>,  
Калініченко О.О.<sup>1</sup>

1 - ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ», м. Харків

2 - ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України

3 - ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК»

4 - Інститут тваринництва УААН

5 - ХНУ ім. В.Н. Каразіна

Відомо, що специфічна активність бактеріальних токсинів залежить від окремих ділянок білкової молекули, які отримали назву «активних центрів» [1-3]. У 1923 році французький вчений Г. Рамон встановив, що обробка формаліном ряду бактеріальних токсинів, призводить до втрати токсичності при збереженні імуногенних властивостей. Отримані препарати Рамон назвав анатоксинами [4]. Модифікаційних змін структури токсинів можливо досягнути генетичним шляхом або хімічним та фізико-хімічним впливом.

На цей час формується новий напрямок у хімії – мікрохвильова ультразвукова хімія (сонохімія). Вказаний напрямок вивчає вплив ультразвукових хвиль на перебіг хімічних реакцій. Під впливом зазначеного фізичного чинника хімічні реакції можуть прискорюватися, як при застосуванні катализаторів, або, за рахунок кавітації, призводити до утворення зовсім інших реакційних продуктів.

Хімічні ефекти кавітації виникають внаслідок сонолюмінесценції (генерація світла при схлопуванні кавітаційних бульбашок) та порівнюються з ефектами дії низькотемпературної плазми та ударної хвилі. Вивчення кавітаційних процесів в магнітних та гравітаційних полях встановило нові ефекти перебігу хімічних реакцій: відбувається збільшення сили тяжіння молекул, їх кластерів і асоціантів, що призводить до зміни градієнту концентрації, зміщує рівновагу, інвертує фази за їх щільністю та змінює швидкість і конкуренцію процесів. [5-7]. Крім того, кавітаційні процеси сприяють дисоціації молекул води на водневі та гідроксильні вільні радикали. Ці радикали можуть рекомбінувати з утворенням електронно-збуджених молекул  $H_2O^*$ . При переході останніх з електронно-збудженого до основного стану утворюється квант світла. Також, за даними літератури в розчинах електролітів, колоїдних розчинах та суспензіях під впливом ультразвукових коливань виникає змінний електричний вібропотенціал Дебая, який може змінювати співвідношення іонів як всередині клітини, так і на її зовнішній мембрані, що призводить до порушень функціонального стану [5-7]. У результаті вищезазначених реакцій ініціюються радикальні хімічні процеси, які можуть призводити до розриву хімічних зв'язків макромолекул, що, в свою чергу, призводить до різноманітних біологічних ефектів [5-8].

**Метою** нашої роботи стало вивчення впливу фізичних та фізико-хімічних чинників на імунобіологічні властивості дифтерійного токсину та його модифікацій.

Робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова АМН України» «Імунобіологічна характеристика окремих фракцій дифтерійного, правцевого анатоксинів та режимів модифікацій екзотоксинів фізико-хімічними методами», галузевий шифр АМН 92/10, № держреєстрації 0110U001414.

### Матеріали і методи.

Об'єктом дослідження був натуральний дифтерійний токсин (ДТ), отриманий з виробництва ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК» (м. Харків), згідно з договором про науково-практичне співробітництво.

Для отримання дериватів ДТ, використовували формалін із різною кінцевою об'ємною долею (0,3% та 0,6%) та температурний чинник (40 °С впродовж 40 діб).

У якості джерела ультразвуку (УЗ) використовувались стандартний генератор ГЗ-109 (частота 60 кГц, потужність 5 Вт) та ультразвуковий прилад ТУ 3468–001–42369179–03 (частота 130 кГц, потужність 9 Вт), надані Інститутом радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України (свідоцтво про атестацію № 100-2751/2008, чинно до 16.12.2011р., видане ДП «Харківський регіональний науково-виробничий центр стандартизації, метрології та сертифікації») згідно з договором про науково-практичне співробітництво.

Кріообробку ДТ було проведено на базі Інституту тваринництва УААН.

Подальша експериментальна робота була проведена на базі ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова АМН України».

**Визначення токсичності дифтерійного токсину (анатоксину) та його складових** проводили на лабораторних тваринах (мурчаки вагою 350–400 г). У день досліду їм голили шкіру з боків ближче до спинки та вводили внутрішньошкірно 0,2 мл нативного або модифікованого токсину. Паралельно з дослідними ставили контрольні проби. За тваринами спостерігали впродовж 72 год. Епідермальні реакції оцінювали наступним чином: 0 - відсутність характерних ознак пошкодження епідермісу, I - гіперемія, II - наявність інфільтрату, III - некроз. Якщо отриманий препарат не викликав місцевих реакцій, або викликав пошкодження I ступеню, які минали протягом 72 год., то він визнавався не токсичним [9].

**Визначення безпечності дифтерійного анатоксину.**

Лабораторним тваринам (мурчаки вагою 350–400 г) вводили підшкірно по 2,5 мл модифікованого токсину (потенційного анатоксину) у кожній бік (загалом 5,0 мл). За тваринами спостерігали впродовж 45 діб. Препарат визнавався безпечним, якщо лабораторні тварини набирали вагу та протягом всього часу спостереження. До того ж, у них були відсутні паралічі, парези та місцеві реакції. Згідно з нормативною документацією в місці введення препарату допускається утворення невеликих ущільнень, які можуть зберігатися впродовж 30 і більше діб. [9]. Мурчаки, які загинули, підлягали розтину та детальному вивченню патологоанатомічної картини внутрішніх органів.

У роботі з тваринами керувались наступними нормативними документами: ДВСТ 421-88 «Тварини

лабораторні. Технологічний процес з дотримання основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментальних наукових цілях» (18.03.1986), Директива ЄВС за № 609 від 24.11.1986 р., Наказ МОЗ України за № 281 від 01.11.2001 р.

*Визначення специфічної (антигенної) активності дифтерійного токсину або анатоксину в реакції флокуляції.*

Для постановки реакції використовували протидифтерійну флокулюючу сироватку (ОСО 42-28-249-10 П, ГІСК ім. Л.А. Тарасевича, Росія). Безпосередньо перед постановкою реакції сироватку розводили в ізотонічному розчині хлориду натрію до кінцевої концентрації 200 Lf у 1 мл.

До однакових за діаметром пробірок наливали розведену флокулюючу сироватку у зростаючому об'ємі (кількість сироватки підбирали з урахуванням титру токсину та його об'єму у суміші) та 2 мл токсину або анатоксину, що досліджувався. Після додавання токсину (анатоксину) до сироватки суміш ретельно перемішували, а штатив із пробірками розміщували на водяній бані при 45-50 °С. При постановці реакції враховували час, що пройшов після змішування сироватки з токсином (анатоксином), до початку ініціальної флокуляції. Пробірка, де флокулят випадав раніше за все, відповідала точці еквівалентності [9]. Рекомендує мий час фокуляційної реакції 5-15 хв., 20-30 хв. – відстрочена реакція. Якщо флокуля-

ція не відбувається впродовж 180 хв. визнається, що препарат не володіє специфічною активністю.

Кількість флокулюючих одиниць (Lf) розраховували за формулою:

$$A = \frac{V \times 200}{2},$$

де А – кількість флокулюючих одиниць;

V – кількість флокулюючої сироватки у точці еквівалентності;

200 – перерахунок на титр сироватки (200 Lf/мл);

2 – перерахунок на кількість токсину (анатоксину) у пробі.

*Статистична обробка досліджень.*

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики як викладено у посібниках [10-13].

Результати обробляли за допомогою персонального комп'ютера із застосуванням комп'ютерних програм Statistika-7, Microsoft Office Excel 2003.

### Результати та обговорення.

На першому етапі наших досліджень був вивчений вплив фізичних чинників (середньо- і низькочастотного ультразвуку, температури) на специфічну активність і безпечність ДТ (табл. 1, 2).

**Таблиця 1 - Специфічна активність дифтерійного токсину в реакції флокуляції до та після дії ультразвуку**

№ п/п	Препарати	Флокулюючі одиниці (Lf), (M±m)	Час флокуляції, (хв.)
1	Нативний дифтерійний токсин (ДТ)	(135±5)	5
2	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 1 год.	(130±5)	5
3	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 2 год.	(130±5)	5
4	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 3 год.	(130±5)	5
5	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 4 год.	(130±5)	5
6	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 5 год.	(130±5)	5
7	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 6 год.	(130±5)	5
8	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 7 год.	(130±5)	5
9	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 1 год.	(130±5)	5
10	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 2 год.	(130±5)	5
11	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 3 год.	(130±5)	5
12	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 4 год.	(130±5)	5
13	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 5 год.	(130±5)	5
14	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 6 год.	(130±5)	5
15	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 7 год.	(130±5)	5
16	ДТ + температура +40 °С (40 діб)	(100±5)	15
17	ДТ + температура -186,6 °С (одноразово)	(130±5)	5

**Таблиця 2 - Токсичність та безпечність дифтерійного токсину до та після дії ультразвуку**

№ п/п	Препарати	Токсичність (24 год. / 72 год.)	Безпечність
1	Нативний дифтерійний токсин (ДТ)	III/III	-
2	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 1 год.	III/III	-
3	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 2 год.	III/III	-
4	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 3 год.	III/III	-
5	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 4 год.	III/III	-
6	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 5 год.	III/III	-
7	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 6 год.	III/III	-
8	ДТ + УЗ (ГЗ - 109) 7 год.	III/III	-
9	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 1 год.	III/III	-
10	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 2 год.	III/III	-
11	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 3 год.	III/III	-
12	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 4 год.	III/III	-
13	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 5 год.	III/III	-
14	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 6 год.	III/III	-
15	ДТ + УЗ (УП ТУ 3468-001-42369179-03) 7 год.	III/III	-
16	ДТ + температура +40 °С (40 діб)	III/III	-
17	ДТ + температура -186,6 °С (одноразово)	III/III	-

Примітки: 0 - відсутність пошкодження епідермісу, I - гіперемія, II - наявність інфільтрату, III - некроз, «+» - препарат є безпечним (тварини живі, набирають вагу), «-» - препарат є небезпечним (тварини загинули).

Експериментально встановлено, що дія на дифтерійний токсин середньо- й низькочастотного ультразвуку в різних режимах (від 1 до 7 годин) не призводила до достовірних змін його специфічної активності та безпечності. Кріогенний температурний чинник також не впливав на специфічну активність ДТ, тоді як вплив температурою 40 °С впродовж 40 діб призводив до зниження специфічної активності на (30±5) Lf.

Під час розтину загиблих тварин, визначено, що у місці введення препаратів спостерігався набряк, зафіксовані крововиливи в тканини, наявність трансудату в плевральній порожнині, багаточисельні геморагії в легенях, виявлена збільшена в розмірах та гіперемована надниркова залоза, а також поодинокі крововиливи в ній.

Таким чином, завдяки проведеними дослідженням доведено, що вплив застосованих фізичних чинників не

викликав руйнування та інактивації нативного дифтерійного токсину.

Токсичність багатьох вакцинних препаратів пов'язана з наявністю шкідливих для людини речовин (формальдегід, мертиолят). Сучасна технологія одержання дифтерійного анатоксину передбачає застосування вказаних хімічних сполук з метою детоксикації субстрату та його подальшого зберігання.

Дослідженнями, які були проведені раніше, встановлено, що зменшення об'ємної долі хімічних модифікаторів, у тому числі й формаліну, в два рази, суттєво не впливало на специфічну активність та безпечність отриманих дериватів ДТ [14]. Тому наступним етапом досліджень стало вивчення дії УЗ в поєднанні з хімічним модифікатором (формаліном) на специфічну активність та безпеку дериватів дифтерійного токсину.

**Таблиця 3 - Специфічна активність дериватів дифтерійного токсину в реакції флокуляції до та після дії ультразвуку**

№ п/п	Препарати	Флокулюючі одиниці (Lf), (M±m)	Час флокуляції, (хв.)
1	Нативний дифтерійний токсин (ДТ)	(135±5)	5
2	ДТ + 0,3% формаліну	(140±5)	15
3	ДТ + 0,6% формаліну	(140±5)	10

4	ДТ + 0,3% формаліну + УЗ (ГЗ - 109) 1 год.	(140±5)	15
5	ДТ + 0,6% формаліну + УЗ (ГЗ - 109) 1 год.	(140±5)	15

Як видно з таблиці 3, зменшення відсоткової частини формаліну в (2,0) рази та застосування ультразвуку

суттєво не впливало на специфічну активність отриманих дериватів токсину.

**Таблиця 4 - Токсичність та безпечність дериватів дифтерійного токсину до та після дії ультразвуку**

№ п/п	Препарати	Токсичність (24 год. / 72 год.)	Безпечність
1	Нативний дифтерійний токсин (ДТ)	III/III	-
2	ДТ + 0,3% формаліну	I/0	+
3	ДТ + 0,6% формаліну	I/0	+
4	ДТ + 0,3% формаліну + УЗ (ГЗ - 109) 1 год.	I/0	+
5	ДТ + 0,6% формаліну + УЗ (ГЗ - 109) 1 год.	0/0	+

Примітки: 0 - відсутність пошкодження епідермісу, I - гіперемія, II – наявність інфільтрату, III – некроз,

«+» - препарат є безпечним (тварини живі, набирають вагу), «-» - препарат є небезпечним (тварини загинули).

При визначенні токсичності отриманих дериватів ДТ за допомогою дермонекротичних проб, встановлено, що гіперемія в першу добу спостереження на місці введення препаратів була тільки у тварин, які отримали проби №№ 2, 3 та 4. У тварин, яким внутрішньошкірно вводили пробу № 5 епідермальні реакції були відсутні.

Розтин мурчаків, які отримали препарати №№ 2-5, показав повну відсутність, як специфічного так і неспецифічного, запалення.

Таким чином, експериментально встановлено, що дериват дифтерійного токсину, отриманий за допомогою фізико-хімічних чинників (формалін, температура, ультразвук), є безпечним та не викликає навіть незначних шкірних реакцій.

#### Висновки

1. Модифікації ДТ, отримані за допомогою дії фізичних чинників (середньо- і низькочастотного ультразвуку, температури), майже не змінюють специфічну активність (окрім проби, на яку впливали температурою 40 °С).
2. Вищезазначені фізичні чинники не впливали на безпечність ДТ.
3. Зменшення концентрації формаліну в два рази (з 0,6 до 0,3 %), суттєво не впливало на специфічну активність отриманих дериватів дифтерійного токсину.
4. Обробка зразків з формаліном ультразвуковим чинником призводила до зниження реакції епідермісу аж до повної відсутності навіть ознак гіперемії.
5. Експериментально визначено, що окремі деривати дифтерійного токсину, отримані за допомогою фізико-хімічних чинників, є безпечними.

#### Список літератури

1. Супотницький, М. В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии [Електронний ресурс] / М. В. Супотницький. - М., 2000. Режим доступу : <http://supotnitskiy.ru/book/book1-1-5.htm>.
2. Романюк, С. І. Антигенні та імунобіологічні властивості дифтерійного токсину і його субодиниць [Текст] : автореф. дис. канд. біол. наук : 02.00.10 / Сергій Іванович

Романюк ; НАН України, ін-т біоорган. хімії та нефтехімії. - К., 2002. - 20 с.

3. Metz, B. Structural Characterisation of Diphtheria Toxoid [Text] / Bernardus Metz. – 2005. - 198 p. – ISBN 90-393-3941-4.

4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Текст] : [учебник для вузов] : под ред. акад. РАМН А. А. Воробьева. – М. : МИА, 2004. – 691 с. : ил. – 5000 экз. – ISBN 5-89481-209-7.

5. Акопян, В. Б. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами: Ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии [Текст] / В. Б. Акопян, Ю. А. Ершов. – М. : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2005. – 224 с. – ISBN 5-7038-2597-0.

6. Бакланов, А. Н. Сонолюминисценция в химическом анализе (Обзор) [Текст] / А. Н. Бакланов, Ф. А. Чмиленко // Методы и объекты химического анализа. – 2006. – т. 1, № 2. – С. 105-107. Режим доступу : [http://www.nbu.gov.ua/portal/chem\\_biol/moca/2006\\_2008/pdf/01022006-105.pdf](http://www.nbu.gov.ua/portal/chem_biol/moca/2006_2008/pdf/01022006-105.pdf)

7. Гайнетдинов, Р. Х. Многопузырьковая сонолюминисценция водных растворов, хлоридов, лантонидов [Текст] : автореф. дис. ...канд. физ.-мат. наук: 02.00.04 / Гайнетдинов Рамиль Халитович ; Башкирский гос. ун-т. – Уфа, 2006. -22 с.

8. Демин, И. Ю. Современные акустические методы исследований в биологии и медицине (учебно-методические материалы) [Електронний ресурс] / И. Ю. Демин, Н. В. Прончатов-Рубцов. Режим доступу : <http://www.unn.ru/pages/issues/aids/2007/37.pdf>

9. Руководство по вакциному и сывороточному делу [Текст] / под ред. П. Н. Бургасова. – М. : «Медицина», 1978. – 440 с.

10. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4.

11. Боровиков, В. П. Statistica. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows [Текст] / В. П. Боровиков, И. П. Боровиков. – М. : Филинь, 1998. – 592 с.

12. Прикладная медицинская статистика [Текст] / [под ред. В. М. Зайцева, В. Г. Лифляндского]. – СПб. : СПбГМА им. И. И. Мечникова, 2000. – 299 с.
13. Гельман, В. Я. Медицинская информатика: практикум [Текст] / В. Я. Гельман. – [2-е изд.]. – СПб. : Питер, 2002. – 480 с.
14. Determination of regimes for diphtheria exotoxin modification by chemical and physicochemical methods [Text] / Babych E.M., Kalinichenko S.V., Ryzhkova T.A., Sklyar N.I. [et al.] // Annals of Mechnikov's Institute. – 2011 - №2. – P. 5-8. Режим доступа : [http://www.nbu.gov.ua/e-journals/AMI/2011\\_2/11bemdrd.pdf](http://www.nbu.gov.ua/e-journals/AMI/2011_2/11bemdrd.pdf)

УДК 579.66:57.042:579.0:579.222.3:60

### **ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ЧИННИКІВ НА ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ**

**Калініченко С.В., Бабич Є.М., Ківва Ф.В., Рябовіл О.В., Горбунов Л.В., Рижкова Т.А., Скляр Н.І., Коваленко О.І., Катріч В.О., Ждамарова Л.А., Бобирева І.В., Ангушева Т.І., Калініченко О.О.**

Вивчено вплив фізичних (ультразвук, температура) та фізико-хімічних (формалін, температура, ультразвук) чинників на імунобіологічні властивості дифтерійного токсину та його модифікацій. Встановлено, що дія застосованих фізичних чинників не викликала руйнування та інактивації нативного дифтерійного токсину. Зменшення об'ємної долі хімічного модифікатора (формаліну), в два рази, суттєво не впливало на специфічну активність та безпечність отриманих дериватів дифтерійного токсину. Обробка зразків з формаліном ультразвуковим чинником призводила до зниження реакції епідермісу аж до повної відсутності навіть ознак гіперемії. Таким чином, визначено, що окремі деривати дифтерійного токсину, отримані за допомогою фізико-хімічних чинників, є безпечними.

УДК 579.66:57.042:579.0:579.222.3:60

### **ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА**

**Калиниченко С.В., Бабич Е.М., Кивва Ф.В., Рябовол Е.В., Горбунов Л.В., Рыжкова Т.А., Скляр Н.И., Коваленко О.И., Катрич В.А., Ждамарова Л.А., Бобырева И.В., Ангушева Т.И., Калиниченко Е.О.**

Изучено влияние физических (ультразвук, температура) и физико-химических (формалин, температура, ультразвук) факторов на иммунобиологические свойства дифтерийного токсина и его модификаций. Установлено, что воздействие указанными физическими факторами не приводило к разрушению и инактивации нативного дифтерийного токсина. Уменьшение объемной доли химического модификатора (формалина), в два раза, существенно не влияло на специфическую активность и безопасность дифтерийного токсина. Обработка образцов с формалином ультразвуком снижала реакцию эпидермиса до полного отсутствия даже признаков гиперемии. Установлено, что отдельные дериваты дифтерийного токсина, полученные с помощью физико-химических факторов, безопасны.

UDC 579.66:57.042:579.0:579.222.3:60

### **THE INFLUENCE OF PHYSICAL AND PHYSICO-CHEMICAL FACTORS ON IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF DIPHTHERIA TOXIN**

**Kalinichenko S.V., Babych, E.M., Kivva F.V., Ryabovol E.V., Gorbunov L.V., Ryzhkova T.A., Sklyar N.I., Kovalenko O.I., Katrych V.A., Zhdamarova L.A., Bobyreva I.V., Kalinichenko E.O.**

The influence of physical (ultrasound, temperature) and physicochemical (formalin, temperature, ultrasound) factors on the immunobiological properties of diphtheria toxin and its modifications was studied. It was established that exposure of these physical factors did not lead to the destruction and inactivation of the native diphtheria toxin. Formalin volume fraction reduction by half did not significantly affect the specific activity and safety of diphtheria toxin. Ultrasonication of the samples with formalin resulted in reduction of epidermal reaction up to the total absence of any signs of hyperemia. It was determined that certain diphtheria toxin derivatives, obtained by physical and chemical factors, are nonhazardous.