

Динамика иммунологических показателей у карпов при воздействии метиленовым синим

Интенсификация промышленного рыбоводства наряду с повышением продуктивности водоемов приводит к ухудшению среды обитания и тем самым снижает устойчивость рыб к инфекционным и инвазионным заболеваниям [3]. Поэтому современной технологией выращивания преобладающего большинства красителей не вызывает сомнений, однако их побочное действие на организм рыб изучено недостаточно. Показано, что некоторые красители в терапевтических дозах могут обладать токсическими и мутагенными свойствами [5, 13, 14].

В официальных инструкциях по применению лекарственных препаратов нет данных о действии их на иммунологический статус рыб [11]. Вместе с тем этот аспект исследований представляет наибольший интерес, поскольку позволяет судить о влиянии лекарственных средств на защитную систему и устойчивость рыб к последующему заражению.

В связи с этим, цель нашей работы — исследовать динамику показателей гуморального и клеточного иммунитета карпа при действии вируса, бактерий и метиленового синего, который используют для борьбы с краснухой и другими болезнями рыб.

Методика

Объектом исследования служили двухлетки карпа средней массой 125 г. При формировании подопытных групп рыб учитывали данные о встречаемости у карпов комплекса болезней, имеющих разную этиологию и объединенных под общим названием краснуха [18]. В настоящее время считают, что краснуха вызывается вирусом, а также бактериями в качестве секундарной инфекции. Эти болезни протекают самостоятельно или в виде смешанных инфекций. Поэтому подопытных рыб заражали вирусом или вирусом с бактериями. Кроме того, учитывая тот факт, что нет работ о влиянии лечебных красителей на иммунный статус рыб, карпов перед заражением обрабатывали метиленовым синим в разных дозировках (лечебной — 100 мг/л и профилактической — 0,05 мг/л). С учетом перечисленных аргументов рыбы в эксперименте были разделены на следующие группы: I группа — неинфицированные (контрольные) карпы (26 рыб); II группа — карпы (25 рыб), которым вводили вирус *Rhabdovirus carpio* (0,5 мл/особь с титром $\log_2 6,5$ ЦПД₅₀/мл); III группа — карпы (30 рыб), обработанные раствором метиленового синего (100 мг/л) в течение 4 ч; IV группа — карпы (30 рыб), обработанные тем же препаратом на протяжении 3 сут при содержании его в воде в количестве 0,05 мг/л; V группа — карпы (26 рыб), которым вводили вирус, а спустя 25 сут — бактерию *Aeromonas hydrophila* ($4 \cdot 10^8$ /особь); VI группа — карпы (20 рыб), обработанные препаратом (100 мг/л), затем через 3 сут зараженные вирусом; VII группа — карпы (20 рыб), обработанные препаратом (0,05 мг/л), а затем в те же сроки зараженные вирусом; VIII группа — карпы (20 рыб), обработанные препаратом (100 мг/л), после чего последовательно зараженные вирусом и бактериями; IX группа — карпы (20 рыб), обработанные препаратом (0,05 мг/л), затем зараженные вирусом и бактериями.

В крови карпов 2—3 раза с интервалом 20 сут определяли: относительное число розеткообразующих клеток — Е-РОК [8], титры комплемента [6], естественных антител, гетероагглютининов [1], антител против вируса [7], бактерицидную активность сыворотки крови — БАСК [12]. Кроме того учитывали число лимфоцитов, эритроцитов и количество гемоглобина [4]. Одновременно на левых жабрах подсчитывали число паразитирующих моногеней (р. *Dactylogirius*), определяли массу и длину тела карпов.

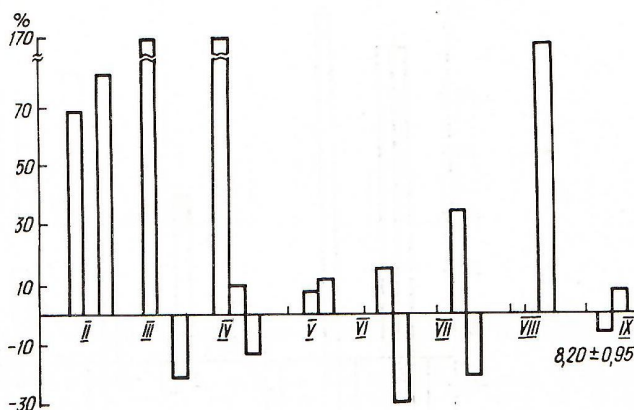
Результаты

Исследование гематологических показателей и содержания антивирусных антител показало, что метиленовый синий и применяемые нами па-

тогены оказывают неодинаковое влияние на физиологический статус карпов. Из табл. 1 видно, что введение вируса вызывает у рыб достоверное увеличение числа лимфоцитов. При этом отмечено недостоверное повышение содержания специфических антител от $0,27 \pm 0,09$ до $0,48 \pm 0,10$. Кроме того наблюдаются уменьшение числа эритроцитов и снижение содержания гемоглобина. Обработка рыб препаратом в разных дозах не вызывает достоверных изменений гематологической кар-

Рис. 1. Динамика Е-РОК в крови карпов при воздействии метиленовым синим, рабдовирусом и аэромонадами в различных сочетаниях.

По горизонтали — относительное число Е-РОК ($8,20 \pm 0,95$) у контрольных рыб (I группа), взятое за точку отсчета; по вертикали — отклонения от контроля у рыб опытных групп (II—IX) через 20, 40 и 60 сут, %.



тины крови. Эти результаты находятся в соответствии с данными литературы [14]. При этом титр ($\log_2$) специфических антител повышается и оказывается в пределах $0,40—0,75$. Обработка рыб препаратом (100 мг/л), а затем заражение вирусом уменьшают число эритроцитов и содержание гемоглобина, но достоверно повышают в крови карпов титр специфических антител до $0,75 \pm 0,10$. Введение карпам вируса и бактерий снижает у них содержание гемоглобина. Последний оказывается ниже нормы и у рыб, обработанных последовательно препаратом, вирусом и бактериями.

Результаты исследования иммунологических показателей и зараженности карпов в динамике представлены на рисунках, из которых видно, что наибольшим колебаниям подвержены титр естественных антител и относительное число Е-РОК. В меньшей мере изменяются БАСК и титр комплемента. В отличие от последнего, который у большинства рыб повышается, БАСК наряду с увеличением в некоторых группах карпа оказывается ниже, чем в контроле.

Детальный анализ результатов, полученных по каждому исследованному показателю, выявил следующее. На рис. 1 видно, что введение карпам рабдовируса (II группа) увеличивает в их крови относительное число Е-РОК, причем высокое значение этого показателя сохраняется на протяжении всего периода проведения эксперимента (60 сут). Обработка рыб метиленовым синим в разных дозах (III, IV группы) приводит вначале к резкому повышению относительного числа Е-РОК, которое, однако, через 40 сут уменьшается до контрольного или оказывается даже ниже его. Введение карпам бактерий после инокуляции вируса (V группа) снижает число Е-РОК по сравнению с таковым для рыб, которых заражали только вирусом. Анализ этого показателя у двухлеток, обработанных препаратом, а затем зараженных вирусом (IV, VII группы), демонстрирует тенденцию, выявленную в опыте с карпами, обработанными только препаратом. Так, после небольшого повышения наблюдается снижение числа Е-РОК ниже контрольных значений. Эти данные с учетом результатов, полученных для рыб II и III групп, позволяют считать, что влияние метиленового синего на относительное число Е-РОК крови карпов оказывается доминирующим. При воздействии на карпов последовательно препаратом, вирусом и бактериями только при высокой концентрации метиленового синего (VIII группа)

отмечено резкое увеличение числа Е-РОК, но лишь на последнем этапе эксперимента.

На рис. 2 видно, что при введении вируса титр естественных антител в сыворотке крови карпов заметно понижается, а затем возрастает. Тот же эффект наблюдается у рыб, обработанных препаратом в дозе 100 мг/л (III группа). Малая концентрация препарата существенного влияния на исследованный параметр не оказывает. Тенденция нараста-

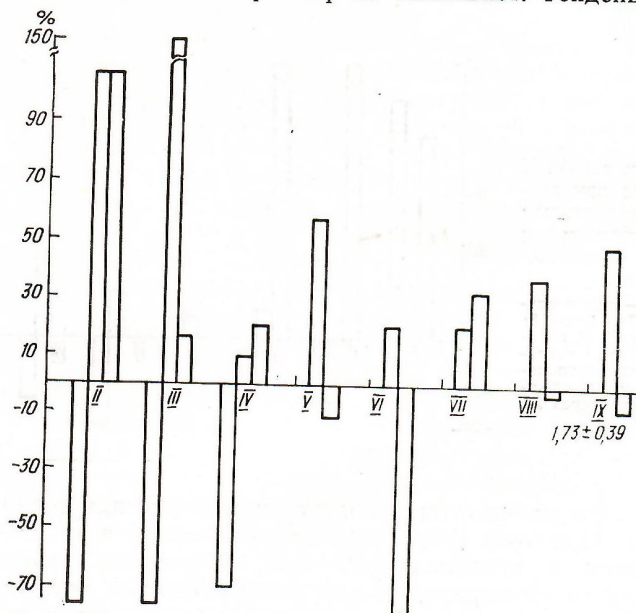


Рис. 2. Динамика естественных антител в сыворотке крови карпов при воздействии метиленовым синим, рабдовирусом и аэромонадами в различных сочетаниях. По горизонтали — титр антител ($1,73 \pm 0,39$) у контрольных рыб (I группа), взятый за точку отсчета; по вертикали — отклонения от контроля у рыб опытных групп (II—IX) через 20, 40 и 60 сут, %.

ния титра антител к концу опыта обнаружена у рыб, обработанных препаратом (100 мг/л), а затем зараженных вирусом (VI группа). В остальных группах рыб (V, VIII, IX) отмечено повышение титра антител спустя 40 сут, а затем снижение его до контрольного значения.

При анализе титра комплемента обнаружено, что после введения рыбам вируса значение этого показателя вначале возрастает, а затем снижается. Заметно различаются по динамике титра комплемента группы карпов, обработанных метиленовым синим в разных дозах (III, IV группы): большая доза препарата вызывает вначале уменьшение, а затем увеличение значения этого показателя, малая — напротив, вначале способствует повышению титра комплемента, который к концу эксперимента уменьшается и становится ниже контрольных значений. Воздействие на рыб последовательно препаратом, вирусом и бактериями

Таблица 1. Гематологические показатели у двухлеток карпа разных групп ($M \pm m$)

Показатель	Групп			
	I	II	III	IV
Число лимфоцитов, тыс.	$36,04 \pm 2,55$ (15)	$60,57 \pm 4,42$ (15)	$40,14 \pm 2,56$ (10)	$28,81 \pm 3,97$ (10)
Число эритроцитов, млн.	$1,68 \pm 0,11$ (15)	$1,43 \pm 0,05$ (15)	$1,65 \pm 0,08$ (17)	$1,77 \pm 0,10$ (10)
Концентрация, Нв, г/л	$83,7 \pm 2,7$ (26)	$75,4 \pm 2,2$ (25)	$76,0 \pm 3,7$ (30)	$79,7 \pm 1,8$ (30)

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число исследованных рыб.

приводит к тому, что карпы, обработанные красителем в дозе 0,05 мг/л (IX группа) спустя 40 сут стали отличаться высоким титром комплемента, тогда как рыбы, подвергнутые действию препарата в дозе 100 мг/л, имели аналогичные значения показателей лишь к концу опыта. Во всех остальных группах двухлеток карпа титр комплемента оставался на уровне, превышающем средние значения этого показателя для рыб контрольной группы (рис. 3).

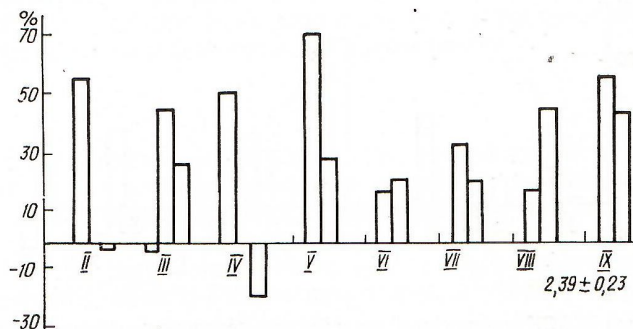


Рис. 3. Динамика комплемента в сыворотке крови карпов при воздействии метиленовым синим, рабдовирусом и аэромонадами в различных сочетаниях.

По горизонтали — титр комплемента ($2,39 \pm 0,23$) у контрольных рыб (I группа), взятый за точку отсчета; по вертикали — отклонения от контроля у рыб опытных групп (II—IX) через 20, 40 и 60 сут, %.

Что касается БАСК, то за время эксперимента она даже у рыб контрольной группы постепенно повышалась. На рис. 4 видно, что у рыб, получавших бактерии (V, VIII, IX группы), значение этого показателя спустя 40 сут было высоким, но к концу опыта уменьшилось и стало ниже контрольных значений. Подобная картина обнаружена у карпов, обработанных красителем (100 мг/л) и зараженных вирусом (VI группа). Рыбы, обработанные препаратом в разных дозах, показывают различие динамики БАСК: у карпов, которых выдерживали в растворе препарата концентрацией 100 мг/л, не выявлено заметных изменений этого показателя, тогда как у рыб, обработанных малыми дозами красителя, БАСК вначале повышается, а затем снижается до значений ниже контрольных.

Особый интерес представляют результаты изучения динамики зараженности карпов исследованных групп. На рис. 5 видно, что при введении вируса инвазия двухлеток увеличивается. Обработка рыб препаратом в дозе 100 мг/л, как и следовало ожидать, эффективно понижает зараженность рыб. Однако воздействие на карпов метиленовым синим в малой дозе через 40 сут резко увеличивает зараженность, которая лишь спустя 60 сут снижается до контрольных значений. По-видимому, малые дозы препарата иногда могут увеличивать численность дактилогирид. Введение вируса и бактерий в наибольшей мере снижает сопротивляемость рыб к инвазии. Обработка карпов препаратом существенно

на					
	V	VI	VII	VIII	IX
	$32,66 \pm 2,59$ (26)	$39,85 \pm 4,74$ (10)	$29,64 \pm 2,17$ (10)	$48,30 \pm 10,06$ (10)	$36,09 \pm 3,22$ (10)
	$1,60 \pm 0,07$ (26)	$1,42 \pm 0,04$ (10)	$1,60 \pm 0,11$ (10)	$1,41 \pm 0,11$ (10)	$1,60 \pm 0,12$ (10)
	$75,4 \pm 2,9$ (25)	$69,2 \pm 2,8$ (20)	$66,9 \pm 3,9$ (20)	$70,9 \pm 4,8$ (20)	$72,4 \pm 3,5$ (20)

не изменяет картину высокой инвазированности рыб, зараженных вирусом и бактериями. Воздействие препаратом в сочетании с вирусом способствует повышению зараженности, особенно если рыб обрабатывали препаратом в дозе 0,05 мг/л.

Заслуживают внимания результаты опытов, полученные для группы рыб, подвергнутых воздействию метиленовым синим (100 мг/л), а затем зараженных вирусом. У 20 % таких карпов обнаружены признаки

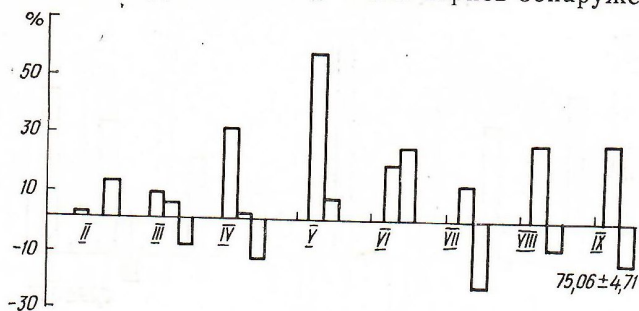


Рис. 4. Динамика БАСК карпов при воздействии метиленовым синим, рабдовирусом и аэромонадами в различных сочетаниях.

По горизонтали — БАСК ($75,06 \pm 4,71$) контрольных рыб (I группа), взятая за точку отсчета; по вертикали — отклонения от контроля у рыб опытных групп (II—IX) через 20, 40 и 60 сут, %.

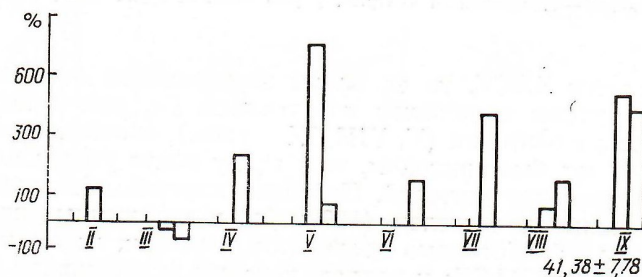


Рис. 5. Динамика зараженности карпов дактилогиридями при воздействии метиленовым синим, рабдовирусом и аэромонадами в различных сочетаниях.

По горизонтали — зараженность ($41,38 \pm 7,78$) контрольных рыб (I группа), взятая за точку отсчета; по вертикали — отклонения от контроля у рыб опытных групп (II—IX) через 20, 40 и 60 сут, %.

краснухи (экзофтальмия, ерошение чешуи). Сравнение их по ряду признаков с остальными рыбами той же группы, а также карпами, контрольной группы показало, что устойчивость первых к воздействию большими дозами препарата в сочетании с вирусом может быть неодинаково-

Таблица 2. Иммунологические показатели у больных и здоровых карпов, обработанных метиленовым синим (100 мг/л) и зараженных рабдовирусом

Показатель	Группа карпов		
	I (контрольные)	IV	
		Без признаков заболевания	Заболевшие
Относительное число Е-РОК, %	$8,00 \pm 1,53$ (10)	$11,38 \pm 0,54$ (16)	$5,88 \pm 0,98^*$ (4)
Титр, $\log_2$ естественных антител	$1,90 \pm 0,66$ (10)	$2,06 \pm 0,66$ (16)	$2,25 \pm 1,44$ (4)
комплемента	$1,90 \pm 0,46$ (10)	$3,13 \pm 0,20^*$ (16)	$2,50 \pm 0,87$ (4)
антивирусных антител	$0,10 \pm 0,10$ (10)	$0,50 \pm 0,16$ (16)	$0,00^*$ (4)
Относительная бактерицидная активность сыворотки крови, %	$61,86 \pm 8,69$ (9)	$91,05 \pm 2,33^*$ (15)	$89,67 \pm 6,92$ (4)

* Различия статистически достоверны

вой (табл. 2). Если у основной массы рыб данной группы число Е-РОК возрастает, то у заболевших особей оно достоверно снижается. Резко уменьшается у них и количество гемоглобина. В то время как титр естественных антител у заболевших рыб существенно не изменяется, титр антивирусных антител — снижается, а у карпов этой группы без признаков заболевания — возрастает. Последние имеют также самые высокие значения титра комплемента и БАСК. Относительно высокая БАСК у больных рыб по сравнению с таковой у контрольных, вероятно, способствовала их выживаемости во время опыта.

Обсуждение

Использование в схеме опыта различных возбудителей краснухи и неодинаковых доз лечебного красителя в разных сочетаниях позволило подойти к оценке информативности иммунологических показателей клеточного и гуморального иммунитета рыб. Показано, что в наибольшей мере изменяются титр естественных антител и относительное число Е-РОК. Увеличение доли Е-РОК в крови карпов, вероятно, указывает на стимулирующее влияние препарата и вируса на систему клеточного иммунитета, играющего важную роль в противовирусной защите. В пользу этой точки зрения свидетельствуют результаты опытов, представленные в табл. 2, из которой видно, что при неблагоприятном сочетании больших доз метиленового синего и вируса число Е-РОК у части карпов, в частности с клиническими признаками краснухи, заметно уменьшается.

Снижение титра естественных антител в первые сутки после обработки рыб препаратом или вирусом можно, по-видимому, рассматривать как позитивное явление (см. табл. 2). Сопоставление контрольных (I группа) и подопытных (VI группа) рыб, где наряду с карпами без признаков краснухи были заболевшие особи, показывает, что у последних при отрицательной реакции на специфические антитела обнаружен самый высокий титр естественных антител. Это дает основание предположить, что в подобных случаях снижение титра естественных антител в некоторой мере связано с параллельной активацией синтеза специфических антител. Очевидно, одновременная выработка определенного числа этих двух категорий антител особенно на первых этапах нецелесообразна, так как выходит за пределы функционального оптимума клеток, ответственных за синтез глобулинов.

Обсуждая результаты, касающиеся метиленового синего как препарата, используемого в лечебных и профилактических целях, следует отметить его иммуномодулирующие свойства. При воздействии препаратом у рыб наблюдается вначале увеличение, а затем уменьшение относительного числа Е-РОК, снижение, а в последствии повышение титра естественных антител, разнонаправленные изменения титра комплемента, зависящие от дозы красителя, и кратковременное повышение БАСК. По-видимому, препарат, воздействуя на вирус и бактерии, которые находятся в организме карпов, способствует дезинтеграции патогенов. В результате могут наблюдаться эффекты увеличения числа Е-РОК, повышения титра комплемента и БАСК спустя 20 или 40 сут после обработки рыб препаратом. Это не противоречит данным литературы, которые указывают на то, что у теплокровных химиотерапия приводит к изменению ряда иммунологических показателей [9]. О том, что в стадах карпа постоянно циркулирует рабдовирус, свидетельствует наличие у контрольных рыб антивирусных антител. Что касается аэромонад, то эти бактерии — типичные обитатели кишечника рыб. При неблагоприятных условиях, особенно в тандеме с вирусом, они способны вызвать инфекционное заболевание с летальным исходом для части пораженных рыб [10].

Обращает на себя внимание тот факт, что обработка карпов препаратом в дозе, рекомендованной инструкциями (100 мг/л), оказывает лечебный эффект, поскольку существенно снижает зараженность карпов дактилогеридами. Однократное воздействие на рыб метиленовым синим

в малой дозе (0,05 мг/л), используемой обычно для профилактики среды обитания, не оказывает терапевтического действия на карпов, ибо их зараженность через 40 сут повышается в 2 раза и только спустя месяц достигает контрольных значений. Поэтому не случайно обработку рыб малыми дозами красителя обычно проводят неоднократно [2]. Антигенная нагрузка на организм леченых рыб, связанная с введением вируса или вируса и бактерий, приводит к повышению зараженности, но численность паразитов у карпов, обработанных препаратом в дозе 100 мг/л, намного меньше растет, чем у рыб, подвергнутых воздействию красителем в дозе 0,05 мг/л.

Введение рыбам вируса особенно в сочетании с бактериями приводит вначале к резкому повышению зараженности карпов, не обработанных метиленовым синим, однако к концу опыта она существенно снижается. Напротив, обработка препаратом, а затем заражение вирусом и бактериями со временем не изменяют высокую зараженность рыб. Складывается впечатление, что при совместном воздействии препаратом и указанными патогенами у рыб могут нарушаться механизмы естественной регуляции численности паразитов.

Несомненный интерес представляют результаты изучения динамики исследованных показателей в зависимости от концентрации метиленового синего. Если малая доза препарата повышает титр комплемента через 20 сут, то аналогичная картина у рыб, обработанных большими дозами, наблюдается спустя 40 и 60 сут. При обработке карпов препаратом в дозе 100 мг/л и заражении их вирусом титр естественных антител только на последнем этапе эксперимента был выше, чем у рыб, которых выдерживали в растворе красителя малой концентрации. Последовательное воздействие препаратом в дозе 100 мг/л, вирусом и бактериями только через 60 сут вызывает заметное увеличение относительного числа Е-РОК. Все эти результаты в совокупности позволяют с большой долей вероятности предполагать, что метиленовый синий в дозе 100 мг/л вначале отрицательно действует на самих паразитов, а спустя некоторое время стимулирует иммунную систему хозяина и тем самым способствует повышению устойчивости рыб к последующему заражению. О том, что стимуляция необходима рыбам для защиты от патогена, убедительно свидетельствуют результаты, представленные в табл. 2. Среди рыб, обработанных препаратом и зараженных вирусом, но не заболевших, значения иммунологических показателей были выше, чем в группе контрольных рыб. Для 20 % рыб этой группы совместное воздействие препаратом и вирусом привело к возникновению признаков вирусемии, тогда как ни одна из рыб, инъецированных вирусом без препарата, не заболела. Это свидетельствует о том, что на первых этапах после обработки препаратом (100 мг/л) сопротивляемость организма рыб понижается. В частности, титр антивирусных антител у некоторых рыб снижается до нуля. Отсюда следует необходимость разработки не только оптимальных дозировок препарата и времени обработки им, но и уточнения сроков начала профилактики заболевания рыб до его возникновения, если оно носит сезонный характер и начало его может быть предсказано. Судя по полученным результатам, лечение рыб незадолго до заболевания или в самом начале его может приводить к гибели части рыб. В этом случае, по-видимому, следует уменьшить дозу препарата или сократить время выдерживания рыб в растворе красителя. Это положение нуждается в экспериментальном обосновании и широкой апробации на практике.

В целом попытка оценить лечебные свойства метиленового синего с позиции его влияния на иммунный статус рыб полностью себя оправдала. С одной стороны, расширение таких исследований позволит специалистам в области профилактики и терапии болезней рыб опираться не только на инструкции, созданные в результате эмпирических подходов, но и на научно обоснованные рекомендации для максимального повышения эффективности и уменьшения побочного действия лечебных опытов препаратов-красителей. С другой стороны, результаты прове-

денных опытов свидетельствуют о том, что информативность ряда использованных иммунологических показателей неодинакова. В случае с вирусом краснухи и метиленовым синим наиболее чувствительными тестами оказались относительное число Е-РОК и титр естественных антител. Среди прочих показателей весьма информативна биоиндикация с помощью эктопаразитов, численность которых при изменении физиологического статуса рыб заметно изменяется.

Выводы

1. Обработка двухлеток карпа метиленовым синим, вирусом, бактериями в различных сочетаниях оказывает влияние на иммунологические, гематологические показатели и зараженность рыб дактилогиридами.

2. Обработка карпов метиленовым синим в дозе 0,05 мг/л (в течение 3 сут) оказывает кратковременное стимулирующее действие на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета.

3. Обработка карпов метиленовым синим в дозе 100 мг/л (в течение 4 ч) оказывает стимулирующее действие на защитную систему не сразу, а спустя 40 сут после выдерживания рыб в растворе красителя. Предполагается, что эффект стимулирования отчасти обусловлен наличием продуктов дезинтеграции патогенов.

4. Обработка карпов метиленовым синим (100 мг/л) и введение им вируса через 3 сут после выдерживания рыб в растворе препарата вызывают у части рыб появление клинических признаков вирусом, что указывает на отрицательный характер совместного воздействия препарата в указанной дозе и вирусом на восприимчивость рыб к инфекции.

5. Для повышения эффективности метиленового синего как лечебного препарата необходимо в дальнейшем уточнить существующие дозировки, а также время выдерживания рыб в растворе красителя на основании результатов изучения влияния его на защитную систему. Особое внимание следует обратить на связь дозировок препарата со сроками обработки рыб, учитывая время возникновения заболевания.

6. Для регистрации изменений, происходящих в иммунном статусе карпов при воздействии метиленовым синим и (или) возбудителями краснухи, следует рекомендовать относительное число Е-РОК и титр естественных антител как наиболее чувствительные показатели по сравнению с титром комплемента и БАСК.

DYNAMICS OF IMMUNOLOGICAL INDICES IN CARPS UNDER THE METHYLENE BLUE EFFECT

I. A. Balakhnin, S. A. Gunkovsky, O. N. Davydov, N. S. Zavodnikova,
I. I. Kozinenko, G. A. Strilko, Yu. D. Temnikhanov

Several immunological and haematological indices as well as infection of carp with ectoparasites of the *Dactylogurum* genus have been studied in fish that have been subjected to methylene blue treatment, to infection with *Rhabdovirus carpio* and *Aeromonas hydrophila* in different combinations. A dosage of 0.05 mg/l (exposure lasting for 3 days) over 20 days increases most of the immunological indices. A treatment of the carp with drug (dosage of 100 mg/l) for 4 hours has a stimulating effect on the immune system over a period of 40-60 days. The infection of the carp with virus immediately after the drug treatment (dosage 100 mg/l) gives rise to a disease of a certain part of fish. In connection with this a problem on terms of the methylene blue treatment is discussed taking into account the development of the disease.

I. I. Schmal'hausen Institute of Zoology, Academy
of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бронникова М. А., Гаркави А. С. Методика и техника судебной экспертизы вещественных доказательств.— М.: Медгиз, 1963.— 275 с.