https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86
УДК 615.19.071

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев

Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева✉

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Тринеева Ольга Валерьевна. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: Н. А. Ковалёва – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665; О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 14.03.2022 **Статья принята в печать:** 27.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Растровая электронная микроскопия – современный метод, позволяющий изучить не только морфологические особенности объектов, но и провести микрорентгеноструктурный анализ. В настоящее время метод активно внедряется в изучение биологических объектов (включая растительные). Облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) листья являются нефармакопейным видом лекарственного растительного сырья. Дальнейшее изучение особенностей морфологии, анатомии и фитохимического состава листьев может способствовать получению новых, в том числе и комбинированных, лекарственных средств, что потребует разработки фармакопейной статьи на данное лекарственное растительное сырье.

Цель. Целью исследования являлось изучение морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев методом растровой электронной микроскопии.

Материалы и методы. Объектом исследования служили высушенные цельные листья облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.), собранные в Воронежской области в 2021 году в период массовой зрелости плодов. Для проведения исследования методом растровой электронной микроскопии кусочки листьев предварительно напыляли золотом на автоматической напылительной установке Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) для повышения проводимости. Микрофотографии получены на электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL Ltd., Япония).

Результаты и их обсуждение. Проведено изучение морфологии, некоторых особенностей анатомического строения облепихи крушиновидной листьев и уточнены основные микродиагностические признаки (характер поверхности, типы трихом, наличие устьиц). Установлено содержание элементов (кремния, калия, алюминия, углерода и кальция) при проведении микрорентгеноструктурного анализа. Получены микрофотографии пыльцевых зерен растения, установлено присутствие в них элемента железа.

Заключение. Впервые использован метод растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. Уточнены основные диагностические признаки листьев и их расположение. Установлено, что в составе элементов сырья преобладает углерод, а также накапливается кальций. Предположено накопление алюминия, кремния и калия в многочисленных волосках, густо покрывающих верхнюю, и особенно нижнюю, поверхности листовой пластинки. Установлена морфология поверхности пыльцевых зерен облепихи крушиновидной, имеющих шарообразную форму с шиповатой оболочкой. Для пыльцевых зерен, кроме углерода, характерно накопление железа и кремния.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, *Hippophaë rhamnoides* L., растровая электронная микроскопия, морфология поверхности листа, идентификация, микрорентгенструктурный анализ, элементный анализ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н. А. Ковалёва осуществляла заготовку и сушку образцов сырья, совместно с сотрудниками ЦКП ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», проводила пробоподготовку к проведению анализа, им проведены исследования морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной с применением растрового электронного микроскопа и программного обеспечения, а также обозначены все рисунки, отражающие основные результаты работы. Совместно с О. В. Тринеевой написала текст статьи. О. В. Тринеева консультировала по полученным результатам, писала заключение и обсуждение результатов.

Для цитирования: Ковалёва Н. А., Тринеева О. В. Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):79–86. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86

Application of Scanning Electron Microscopy to Study Morphological and Anatomical Features of Sea Buckthorn Leaves

Natalia A. Kovaleva, Olga V. Trineeva✉

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

✉ **Corresponding author:** Olga V. Trineeva. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: Natalia A. Kovaleva – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665; Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 14.03.2022 **Revised:** 27.03.2023 **Published:** 25.05.2023

© Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., 2023
© Kovaleva N. A., Trineeva O. V., 2023

Abstract
Introduction. Scanning electron microscopy is a modern method that allows us to study not only the morphological features of objects, but also to conduct micro-X-ray structural analysis. Currently, the method is being actively introduced into the study of biological objects (including plant ones). Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaves are a non-pharmacopoeial type of medicinal plant raw materials. Further study of the morphology, anatomy and phytochemical composition of leaves can contribute to the production of new, including combined, medicines, which will require the development of a pharmacopoeia article for this medicinal plant raw material.
Aim. The aim of the study was to study the morphological and anatomical features of sea buckthorn leaves by scanning electron microscopy.
Materials and methods. The object of the study was dried whole leaves of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.), collected in the Voronezh region in 2021 during the period of mass fruit maturity. To carry out the study by scanning electron microscopy, pieces of leaves were previously sprayed with gold on an automatic spraying unit Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., United Kingdom) to increase conductivity. Micrographs were obtained using an electron microscope JSM-6510LV (JEOL Ltd., Japan).
Results and their discussion. The morphology and some features of the anatomical structure of sea buckthorn leaves were studied and the main microdiagnostic signs (surface character, types of trichomes, the presence of stomata) were clarified. The content of elements (silicon, potassium, aluminum, carbon and calcium) was determined during the microrentgenostructural analysis. Micrographs of pollen grains of the plant were obtained, the presence of the element iron in them was established.
Conclusion. For the first time, the method of scanning electron microscopy was used to study the morphological and anatomical features of sea buckthorn leaves. The main diagnostic signs of leaves and their location have been clarified. It has been established that carbon predominates in the composition of the raw material elements, and calcium also accumulates. The accumulation of aluminum, silicon and potassium in numerous hairs densely covering the upper, and especially the lower, surfaces of the leaf blade is assumed. The morphology of the surface of pollen grains of sea buckthorn, having a spherical shape with a spiny shell, has been established. Pollen grains, in addition to carbon, are characterized by the accumulation of iron and silicon.

Keywords: sea buckthorn, *Hippophaë rhamnoides* L., scanning electron microscopy, morphology of the leaf surface, identification, microrentgenstructural analysis, elemental analysis

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Natalia A. Kovaleva carried out the preparation and drying of raw material samples, together with the staff of the Central Research Institute of the Voronezh State University, conducted sample preparation for analysis, she conducted studies of morphological signs of sea buckthorn leaves using a scanning electron microscope and software, and also indicated all the drawings reflecting the main results of the work. Together with Olga V. Trineeva wrote the text of the article. Olga V. Trineeva consulted on the results obtained, wrote a conclusion and discussion of the results.

For citation: Kovaleva N. A., Trineeva O. V. Application of scanning electron microscopy to study morphological and anatomical features of sea buckthorn leaves. *Drug development & registration*. 2023;12(2):79–86. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86

ВВЕДЕНИЕ

Растровая электронная микроскопия (РЭМ) – современный оптический метод исследования материалов и структур. В настоящее время метод позволяет получить не только изображения высокого разрешения, но и провести рентгеноспектральный микроанализ [1].

Пробоподготовка биологических образцов (включая растительные объекты) включает в себя вакуумное напыление благородных металлов (золото, серебро, платина) на их поверхность для придания электропроводности, так как объекты органической природы состоят из элементов с низким молекулярным весом и, следовательно, характеризуются малыми значениями данного показателя [2]. После проведения подобной пробоподготовки строение образцов растительного происхождения возможно анализировать методом РЭМ.

Еще одним методом пробоподготовки биологических объектов является сушка в критической точке (универсальный метод). РЭМ проводится в режиме высокого вакуума, что позволяет получать изображения с полной визуализацией всех элементов изучаемого объекта и особенностей их строения [3].

В частности, благодаря методу РЭМ можно изучить морфологию поверхности различных объектов и получить данные о составе их элементов. Несмотря на пока ограниченное применение данного метода в медицине и фармации, заключающегося в оценке строения поверхности технологических полупродуктов (микрокапсул, наночастиц и твердых дисперсий) при создании различных лекарственных форм, РЭМ активно начинает использоваться в анализе морфологии поверхности растительных объектов. Примером может служить РЭМ поверхности различных морфологических органов травы рода горцев (*Persicaria* Mill.) и листьев представителей рода вишни (*Prunus* L.) [4, 5]. Известно также применение метода в изучении морфологии микрокапсул с винпоцетином [6].

В медицине РЭМ применяется в изучении изменения клеток органов и биологических жидкостей при различных видах воспалений и инфекций (патологии суставов, травматическое инфицирование), эритроцитов крови при различных патологиях, а также в исследованиях в области стоматологии [7–14].

В настоящее время облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) листья являются нефармакопейным видом лекарственного растительного сы-

рья (ЛРС). Однако, на основе их полифенольного комплекса разработан и зарегистрирован лекарственный растительный препарат «Гипорамин», что, конечно же, не реализует в полной мере потенциал листьев, являющихся зачастую отходом при заготовке плодов. Иностранные ученые (особенно из Индии, где облепиха крушиновидная имеет обширный ареал распространения) занимаются исследованиями экстрактов из листьев более активно на предмет выявления различных видов фармакологической активности. В частности, доказаны антиоксидантные, иммуномодулирующие, противовирусные, противогрибковые, гипогликемические и антипролиферативные свойства на модели экспериментального артрита [15–30]. Дальнейшее изучение особенностей морфологии, анатомии и фитохимического состава листьев может способствовать получению новых, в том числе и комбинированных, лекарственных средств, что потребует разработки фармакопейной статьи (ФС) на данное ЛРС, и также обусловливает актуальность проводимых нами исследований. Использование РЭМ в изучении микродиагностических признаков позволит, наряду с другими известными методами микроскопических исследований [31], сформировать раздел ФС «Микроскопия».

Целью исследования являлось изучение морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев методом растровой электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высушенные цельные листья облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.), собранные в Воронежской области в 2021 году в период массовой зрелости плодов. Сырье было высушено методом воздушно-теневой сушки.

Для проведения исследования методом РЭМ кусочки листьев предварительно напыляли золотом на автоматической напылительной установке Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) для повышения проводимости. Микрофотографии получены на электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL Ltd., Япония). Обработка результатов проведена при помощи программного обеспечения ESPRIT 1.9. Исследования проведены в ЦКП научным оборудованием ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получены микрофотографии, отражающие основные диагностические признаки верхней и нижней поверхностей листовой пластины. В процессе сушки на листе образовались складки, которые помешали визуализации некоторых микродиагностических признаков.

Лист сверху рыхло покрыт щитковидными и щитковидно-звездчатыми волосками. Часть трихом имеют воронковидное углубляющееся основание, а часть – пикообразное, выступающее над поверхностью (рисунок 1, А, Б). Щитковидно-звездчатые волоски имеют лучи различной длины. Клетки многоугольные, с утолщенными стенками (рисунок 1, А). Край листовой пластины завернут книзу (рисунок 1, Е). Центральная жилка погруженная, покрыта звездчатыми трихомами с длинными, переплетающимися между собой лучами (рисунки 1, В, Г). Визуализируются округлые пыльцевые зерна растения с шиповатой поверхностью (рисунок 1, Д). Сохранение пыльцы на листьях связано с тем, что облепиха – ветроопыляемый двудомный кустарник и мужские и женские деревья могут находиться на достаточно далеком расстоянии друг от друга. При попадании пыльцы на лист, она задерживается лучами звездчатых волосков, что является приспособлением к размножению. Устьица на верхней стороне отсутствуют.

Нижняя поверхность листовой пластины, включая выступающую центральную жилку (рисунок 2, А), плотно покрыта щитковидно-звездчатыми и щитковидными трихомами (рисунок 2, Б). Звездчатые трихомы встречаются реже, в основном по жилке. Сплошное покрытие поверхности листа волосками затрудняет визуализацию других диагностических признаков (формы клеток, наличие устьиц и их тип). При снятии верхнего слоя трихом (рисунок 2, В) определяется сетчатое жилкование листовой пластины. Частицы поврежденных волосков и клеток не позволяют идентифицировать тип устьичного аппарата, но сами устьица отчетливо визуализируются (рисунок 2, Г).

В работе также проведен микрорентгеноструктурный анализ и получены рентгеновские спектры (рисунок 3). В результате методом РЭМ установлено наличие некоторых элементов, содержащихся во фрагменте листовой пластины, пыльцевом зерне, а также фрагменте листа после удаления слоя волосков. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание элементов в листе облепихи крушиновидной

Table 1. The content of elements in the Sea buckthorn leaf

Элемент Element	Содержание элементов, % Content of elements, %					
	Лист Leaf		Лист без слоя волосков Leaf without layer of hairs		Пыльца Pollen	
	Вес The weight	Атом Atom	Вес The weight	Атом Atom	Вес The weight	Атом Atom
C	78,8	91,7	68,7	88,0	93,0	97,5
Al	1,3	0,7	–	–	–	–
Si	4,5	2,3	–	–	3,4	1,5
K	1,5	0,5	–	–	–	–
Ca	13,9	4,9	31,3	12,0	2,2	0,7
Fe	–	–	–	–	1,3	0,3

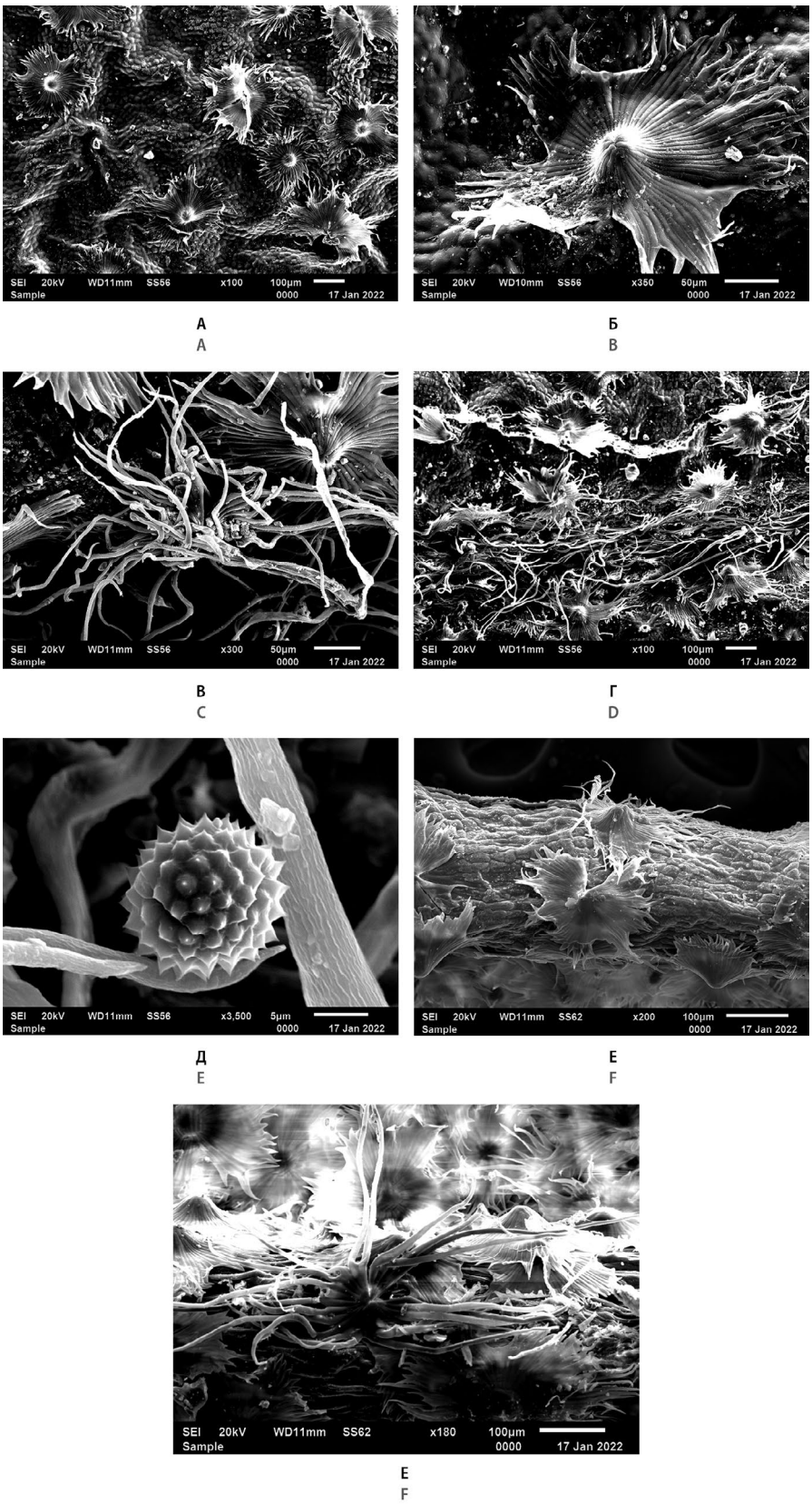


Рисунок 1. Микрофотографии верхней поверхности листа, полученные методом РЭМ.

А × 100, Б × 350 – щитковидные волоски; В × 300 – звездчатый волосок; Г × 100 – центральная жилка; Д × 3500 – пыльцевое зерно; Е × 200 – край листовой пластины; Ж × 180 – щитковидно-звездчатый волосок

Figure 1. Micrographs of the upper surface of the leaf obtained by the SEM method.

A × 100, B × 350 – corymbose hairs; C × 300 – stellate hair; D × 100 – central vein; E × 3500 – pollen grain; F × 200 – edge of the leaf plate; G × 180 – corymbose-stellate hair

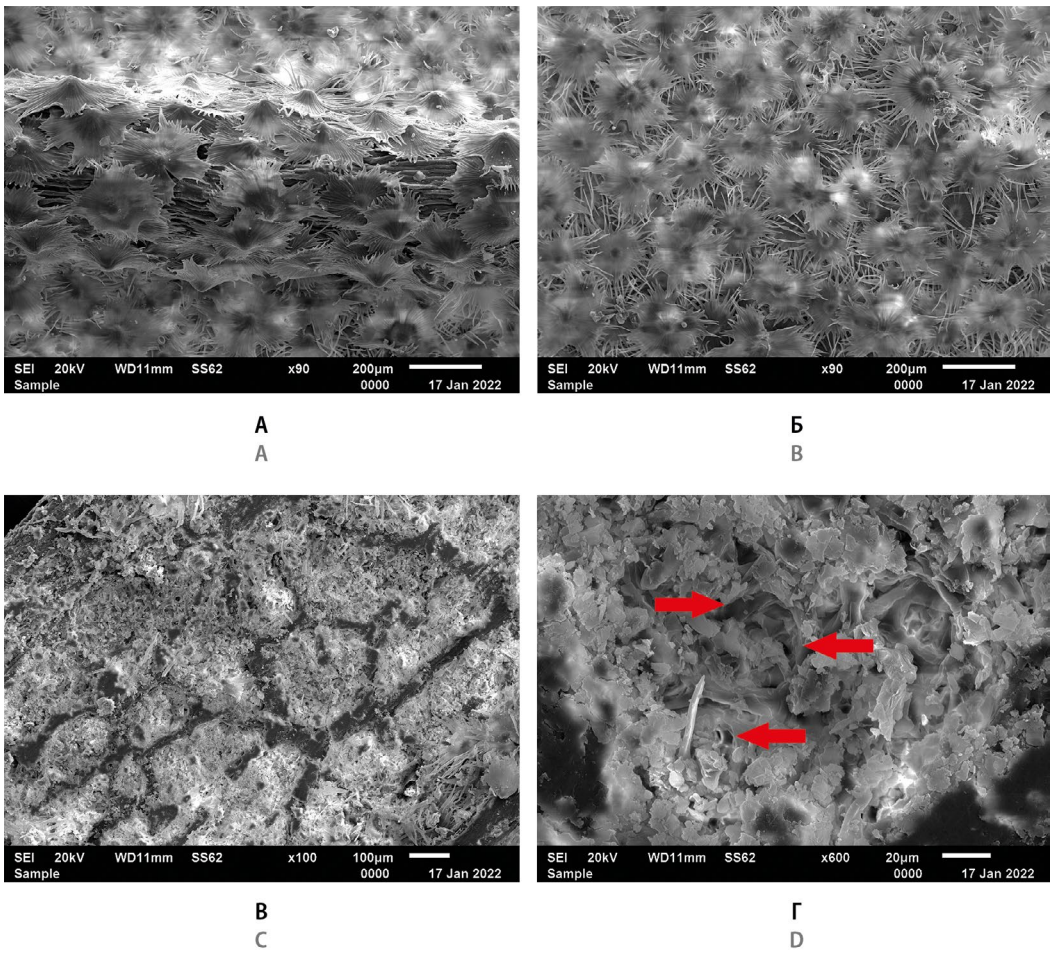


Рисунок 2. Микрофотографии нижней поверхности листа.

А – центральная жилка; Б – щитковидные и щитковидно-звездчатые трихомы; В – поверхность без слоя волосков; Г – устьица

Figure 2. Micrographs of the lower surface of the leaf.

A – central vein; B – corymbose and corymbose-stellate trichomes; C – surface without a layer of hairs; D – stomata

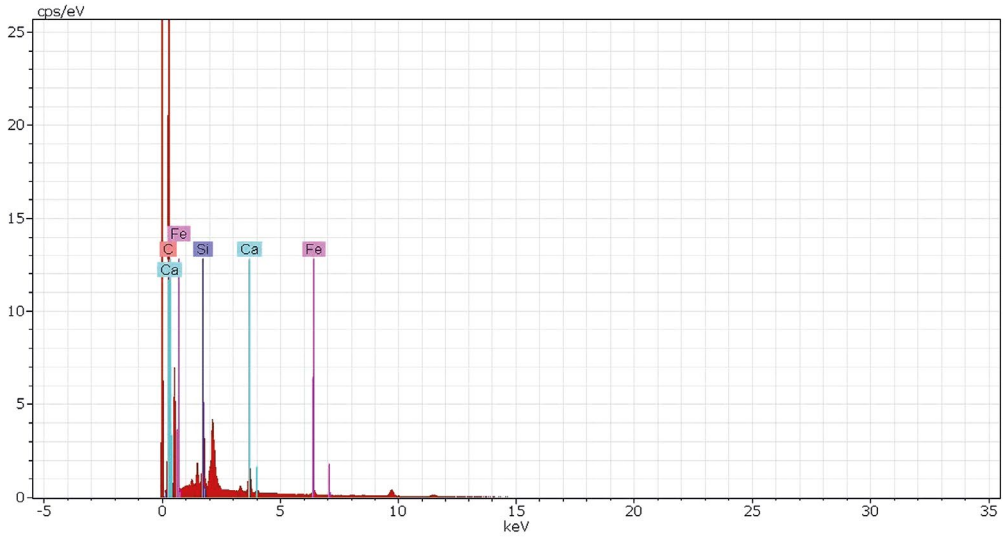
Согласно полученным данным, наибольшую долю в составе элементов занимает углерод, что и следовало ожидать. Это связано с органической природой изучаемого объекта. Отмечено значительное содержание кальция. Отсутствие алюминия, кремния и калия во фрагменте листа, очищенном от трихом, может свидетельствовать о накоплении данных элементов именно в волосках. При анализе пыльцы, кроме преобладающего содержания углерода, отмечается накопление кремния и кальция, а также железа, что объясняется защитной функцией прочной шиповатой оболочки пыльцевого зерна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

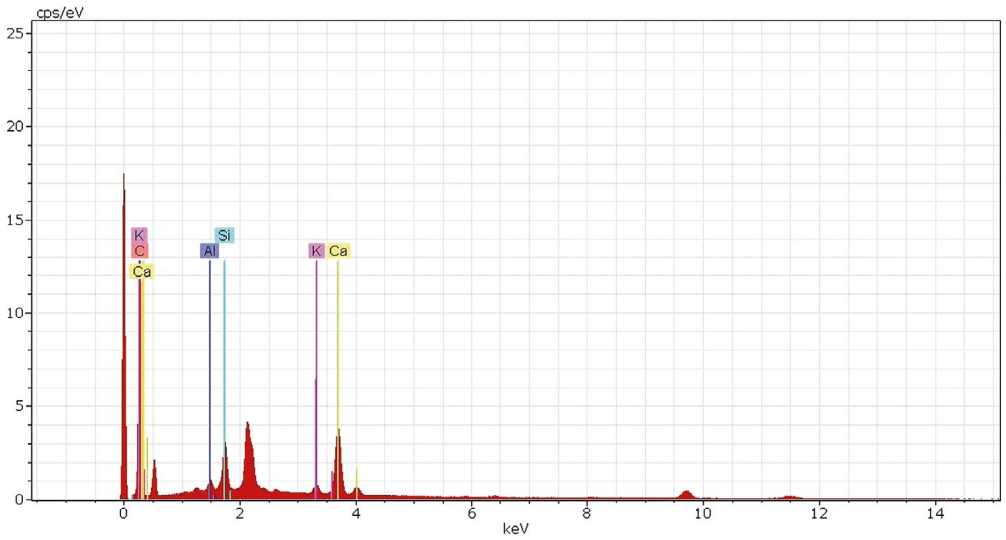
Таким образом, нами впервые использован метод РЭМ для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. Уточнены основные диагностические признаки листьев и их расположение. Установлено, что в составе элементов сырья преобладает углерод, а также накапливается кальций. Предположено накопление алюминия, кремния и калия в многочисленных волосках, густо покрывающих верхнюю, и особенно нижнюю, поверхности листовой пластинки. Установлена морфология поверхности пыльцевых зерен облепихи крушиновидной, имеющих шарообразную форму с шиповатой оболочкой. Для пыльцевых зерен, кроме углерода, характерно накопление железа и кремния.

ЛИТЕРАТУРА

1. Конников С. Г. Количественная растровая электронная микроскопия материалов и структур твердотельной электроники. *Научное приборостроение*. 2000;1:3–13.
2. Лунев А. А. Основы растровой электронной микроскопии и подготовка образцов. *Молодой ученый*. 2021;21(363):98–101.
3. Камышинский Р. А., Орехов А. С., Григорьев Т. Е., Куевда Е. В., Губарева Е. А., Токаев К. В., Чвалун С. Н., Васильев А. Л. Сравнительный анализ различных методов растровой электронной микроскопии и пробоподготовки в исследованиях биологических тканей. *Кристаллография*. 2019;64(3):438–441. DOI: 10.1134/S0023476119030135.
4. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Синецкая Д. А., Сливкин А. И., Болгов А. С., Болгова М. А. Растровая электронная микроскопия в анализе видов рода *Persicaria* Mill. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):99–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105.



А
А



Б
В

Рисунок 3. Рентгеновские спектры листа облепихи крушиновидной, полученные методом РЭМ.
А – состав элементов пыльцевого зерна; Б – состав элементов листа, покрытого трихомами

Figure 3. X-ray spectra of a sea buckthorn leaf, obtained by scanning electron microscopy.
A – composition of pollen grain elements; B – composition of leaf elements covered with trichomes

5. Мотылева С. М. Сравнительные исследования морфолого-анатомических признаков листьев представителей рода *Prunus* L. s. l. методом растровой электронной микроскопии. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*. 2017;16: 135–138.
6. Северинова Н. А. Изучение особенностей поверхности альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином методом растровой электронной микроскопии. В сб.: Теоретические и практические аспекты современной медицины: Материалы 91-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых; 18 апреля 2019 года; Симферополь, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского; 2019. 444 с. Доступно по: https://ma.cfuv.ru/page/show/docid/240454?locale=en. Ссылка активна на 05.09.2022.
7. Ярмамедов Д. М., Липатов В. А., Медведева М. В., Захарова К. В. Исследование динамики изменений площади клеток роговицы после инфицированного травматического поражения методом растровой электронной микроскопии. *Вестник Башкирского государственного медицинского университета*. 2019;3:157–163.
8. Алексеев Р. З., Гольдерова А. С., Маркова О. Г., Мамаева С. Н., Николаева Н. А., Крылова Т. А., Дьяконов А. А. Характеристика микрокристаллов синовиальной жидкости при патологии суставов методом растровой электронной микроскопии. В сб.: III Международный конгресс ассоциации ревмоортопедов; 20–21 сентября 2019 года; Москва; 2019. 136 с. Доступно по: https://elibrary.ru/download/elibrary_41504349_23188760.pdf. Ссылка активна на 05.09.2022.

9. Мамаева С. Н., Мунхалова Я. А., Конова И. В., Дьяконов А. А., Корякина В. Н., Шутова В. В., Максимов Г. В. Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии. *Вестник Мордовского университета*. 2016;26(3):381–390. DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.381-390.
10. Мамаева С. Н., Максимов Г. В., Антонов С. Р., Мунхалова Я. А., Дьяконов А. А., Винокуров П. В. Исследование эритроцитов крови детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии с использованием растровой электронной и атомно-силовой микроскопии. *Медицинская физика*. 2017;1(73):58–63.
11. Гольдерова А. С., Платонова В. А., Алексеев Р. З., Гоголева Т. Е., Трифонова Л. Ю., Григорьева Л. В., Мамаева С. Н. Оценка изменений эритроцитов с помощью атомно-силовой и растровой электронной микроскопии (смерть от переохлаждения). *Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М. К. Аммосова. Серия: Медицинские науки*. 2019;2(15):8–17. DOI: 10.25587/SVFU.2019.2(15).31306.
12. Алексеев Р. З., Гольдерова А. С., Мамаева С. Н., Николаева Н. А., Бузинаева М. Т. Оценка изменения эритроцитов методом растровой электронной микроскопии у лиц, умерших от переохлаждения. *Якутский медицинский журнал*. 2018;4(64):18–21. DOI: 10.25789/YMJ.2018.64.05.
13. Бессуднова Н. О., Биленко Д. И., Вениг С. Б., Аткин В. С., Галушка В. В., Захаревич А. М. Экспериментальное исследование кристаллических образований, обнаруженных на поверхности дентина, методами растровой электронной микроскопии. *Молекулярная медицина*. 2012;5:55–61.
14. Бессуднова Н. О., Вениг С. Б., Ревзина Е. М., Шляпникова О. А., Грибов А. Н. Применение методов атомно-силовой и растровой электронной микроскопии с целью визуальной диагностики состояния адгезивных соединений твердых тканей зуба и композиционных полимерных материалов при ударных циклических термонагрузках. *Вестник новых медицинских технологий*. 2017;4:244–251. DOI: 10.12737/article_5a0589ffd7f1c7.76704976.
15. Arimboor R., Kumar K. S., Arumughan C. Simultaneous estimation of phenolic acids in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;47(1):31–38. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.11.045.
16. Begaa S., Messaoudi M. Toxicological aspect of some selected medicinal plant samples collected from Djelfa, Algeria Region. *Biological trace element research*. 2019;187(1):301–306. DOI: 10.1007/s12011-018-1365-3.
17. Dharam P. A., Amrit K. S., Jyoti K., Tanveer N. Pharmacognostical Characterization & Preliminary Phytochemical Investigation of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;2(2):108–113.
18. Pop R. M., Weesepoel Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J. P., Gruppen H. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem*. 2014;147:1–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.083.
19. Saggu S., Divekar H. M., Gupta V., Sawhney R. C., Banerjee P. K., Kumar R. Adaptogenic and safe-ty evaluation of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(4):609–617. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.008.
20. Szakova J., Tlustoš P., Goessler W., Pokorný T., Findenig S., Balik J. The Effect of Soil Contamination Level and Plant Origin on Contents of Arsenic, Cadmium, Zinc, and Arsenic Compounds in Mentha Aquatica L. *Archives of Environmental Protection*. 2011;37(2):109–121.
21. Usha T., Middha S. K., Goyal A. K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V. Molecular docking studies of anticancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia*. *The Journal of Biomedical Research*. 2014;28(5):406–415. DOI: 10.7555/JBR.28.20130110.
22. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S. C., Sharma M., Singh S., Kumar H. T., Singh A. K., Nivsarkar M., Kaushik M. P., Sawhney R. C., Chaurasia O. P., Prasad G. B. Protective effect of ethanolic and water extracts of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006;44(10):821–831.
23. Padwad Y., Ganju L., Jain M., Chanda S., Karan D., Banerjee P. K., Sawhney R. C. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *International immunopharmacology*. 2006;6(1):46–52. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.07.015.
24. Tanwar H., Shweta, Singh D., Singh S. B., Ganju L. Anti-inflammatory activity of the functional groups present in *Hippophae rhamnoides* (Seabuckthorn) leaf extract. *Inflammopharmacology*. 2018;26(1):291–301. DOI: 10.1007/s10787-017-0345-0.
25. Ren Z., Gong, H., Zhao A., Zhang J., Yang C., Wang P., Zhang Y. Effect of Sea Buckthorn on Plasma Glucose in Individuals with Impaired Glucose Regulation: A Two-Stage Randomized Crossover Intervention Study. *Foods*. 2021;10(4):804. DOI: 10.3390/foods10040804.
26. Mir M. A., Mir B. A., Singh D., Rao Z. Studies on the Anti-Inflammatory Properties of Various extracts of *Hippophae rhamnoide*. *Journal of pharmacology & clinical research*. 2017;2(2):555584. DOI: 10.19080/JPCR.2017.02.555584.
27. Verma H., Sharma M., Chahota R., Palial A. Assessment of antimycotic activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf exacts against common fungi associated with skin dermatitis. *Vet. World*. 2013;6(4):205–208. DOI: 10.5455/vetworld.2013.205-208.
28. Крамарьов С. О., Євтушенко В. В., Шадрин В. О., Головач О. В., Камінська Т. М. Застосування екстракту з листя *Hippophae rhamnoides* у терапії вітряної віспи в дітей. *Aktual'naâ Infektologiâ*. 2018;6(2):77–82. DOI: 10.22141/2312-413x.6.2.2018.131093.
29. Ganju L., Padwad Y., Singh R., Karan D., Chanda S., Chopra M. K., Bhatnagar P., Kashyap R., Sawhney R. C. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International immunopharmacology*. 2005;5(12):1675–1684. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.017.
30. Geetha S., Sai Ram M., Singh V., Ilavazhagan G., Sawhney R. C. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an in vitro study. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(3):373–378. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00406-8.
31. Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Гудкова А. А., Сливкин А. И. Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):123-131. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131.

REFERENCES

1. Konnikov S. G. Quantitative scanning electron microscopy of materials and structures of solid-state electronics. *Nauchnoe priborostroenie*. 2000;1:3–13. (In Russ.)
2. Lunev A. A. Fundamentals of scanning electron microscopy and sample preparation. *Molodoy uchenyy*. 2021;21(363):98–101. (In Russ.)
3. Kamyshinsky R. A., Orekhov A. S., Grigoriev T. E., Kuevda E. V., Gubareva E. A., Tokaev K. V., Chvalun S. N., Vasiliev A. L. Comparative analysis of various methods of scanning electron microscopy and sample preparation in studies of biological tissues. *Kristallografiya*. 2019;64(3):438–441. DOI: 10.1134/S0023476119030135.
4. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sinetskaya D. A., Slivkin A. I., Bolgov A. S., Bolgova M. A. Scanning electron microscopy in the analysis of species of the genus *Persicaria* Mill. *Drug development & registration*. 2022;11(1):99–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105. (In Russ.)
5. Motyleva S. M. Comparative studies of the morphological and anatomical characteristics of the leaves of representatives of the genus *Prunus* L. s. l. by scanning electron microscopy. *Problemy botaniki Yuzhnoy Sibiri i Mongolii*. 2017;16:135–138. (In Russ.)
6. Severinova N. A. Study of surface features of alginate-chitosan microcapsules with vinpocetine by scanning electron microscopy. In: Theoretical and practical aspects of modern medicine: Proceedings of the 91st international scientific and practical conference and young scientists; April 18, 2019; Simferopol, Medical Academy. S. I. Georgievskogo; 2019. 444 p. Available at: https://ma.cfuv.ru/page/show/docid/240454?locale=en. Accessed: 05.09.2022. (In Russ.)
7. Yarmamedov D. M., Lipatov V. A., Medvedeva M. V., Zakharova K. V. Study of the dynamics of changes in the area of corneal cells after an infected traumatic lesion using scanning electron microscopy. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2019;3:157–163. (In Russ.)

8. Alekseev R. Z., Golderova A. S., Markova O. G., Mamaeva S. N., Nikolaeva N. A., Krylova T. A., Dyakonov A. A. Characterization of synovial fluid microcrystals in joint pathology by scanning electron microscopy. In: III International Congress of the Association of Rheumatic Orthopedists; September 20–21, 2019; Moscow; 2019. 136 p. Available at: https://elibrary.ru/download/elibrary_41504349_23188760.pdf. Accessed: 05.09.2022. (In Russ.)
9. Mamaeva S. N., Munkhalova Ya. A., Konova I. V., Dyakonov A. A., Koryakina V. N., Shutova V. V., Maksimov G. V. Examination of blood erythrocytes by scanning electron microscopy. *Mordovia University Bulletin*. 2016;26(3):381–390. (In Russ.) DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.381-390.
10. Mamaeva S. N., Maksimov G. V., Antonov S. R., Munkhalova Ya. A., Dyakonov A. A., Vinokurov P. V. Study of blood erythrocytes in children with kidney diseases with hematuria syndrome using scanning electron and atomic force microscopy. *Meditsinskaya fizika*. 2017;1(73):58–63. (In Russ.)
11. Golderova A. S., Platonova V. A., Alekseev R. Z., Gogoleva T. E., Trifonova L. Yu., Grigorieva L. V., Mamaeva S. N. Evaluation of changes in erythrocytes using atomic force and scanning electron microscopy (death from hypothermia). *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta im. M. K. Ammosova. Seriya: Meditsinskie nauk*i. 2019;2(15):8–17. (In Russ.) DOI: 10.25587/SVFU.2019.2(15).31306.
12. Alekseev R. Z., Golderova A. S., Mamaeva S. N., Nikolaeva N. A., Buzinaeva M. T. Evaluation of changes in erythrocytes by scanning electron microscopy in persons who died from hypothermia. *Yakut medical journal*. 2018;4(64):18–21. (In Russ.) DOI: 10.25789/YMJ.2018.64.05.
13. Bessudnova N. O., Bilenko D. I., Venig S. B., Atkin V. S., Galushka V. V., Zakharevich A. M. Experimental study of crystalline formations found on the surface of dentin using scanning electron microscopy. *Molecular medicine*. 2012;5:55–61. (In Russ.)
14. Bessudnova N. O., Venig S. B., Revzina E. M., Shlyapnikova O. A., Gribov A. N. Application of atomic force and scanning electron microscopy methods for the purpose of visual diagnostics of the state of adhesive joints of dental hard tissues and composite polymer materials under shock cyclic thermal loads. *journal of new medical technologies*. 2017;4:244–251. (In Russ.) DOI: 10.12737/article_5a0589ffd7f1c7.76704976.
15. Arimboor R., Kumar K. S., Arumughan C. Simultaneous estimation of phenolic acids in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;47(1):31–38. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.11.045.
16. Begaa S., Messaoudi M. Toxicological aspect of some selected medicinal plant samples collected from Djelfa, Algeria Region. *Biological trace element research*. 2019;187(1):301–306. DOI: 10.1007/s12011-018-1365-3.
17. Dharam P. A., Amrit K. S., Jyoti K., Tanveer N. Pharmacognostical Characterization & Preliminary Phytochemical Investigation of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;2(2):108–113.
18. Pop R. M., Weesepoel Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J. P., Gruppen H. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem*. 2014;147:1–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.083.
19. Saggu S., Divekar H. M., Gupta V., Sawhney R. C., Banerjee P. K., Kumar R. Adaptogenic and safe-ty evaluation of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(4):609–617. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.008.
20. Szakova J., Tlustoš P., Goessler W., Pokorný T., Findenig S., Balik J. The Effect of Soil Contamination Level and Plant Origin on Contents of Arsenic, Cadmium, Zinc, and Arsenic Compounds in Mentha Aquatica L. *Archives of Environmental Protection*. 2011;37(2):109–121.
21. Usha T., Middha S. K., Goyal A. K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V. Molecular docking studies of anticancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia*. *The Journal of Biomedical Research*. 2014;28(5):406–415. DOI: 10.7555/JBR.28.20130110.
22. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S. C., Sharma M., Singh S., Kumar H. T., Singh A. K., Nivsarkar M., Kaushik M. P., Sawhney R. C., Chaurasia O. P., Prasad G. B. Protective effect of ethanolic and water extracts of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006;44(10):821–831.
23. Padwad Y., Ganju L., Jain M., Chanda S., Karan D., Banerjee P. K., Sawhney R. C. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *International immunopharmacology*. 2006;6(1):46–52. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.07.015.
24. Tanwar H., Shweta, Singh D., Singh S. B., Ganju L. Anti-inflammatory activity of the functional groups present in *Hippophae rhamnoides* (Seabuckthorn) leaf extract. *Inflammopharmacology*. 2018;26(1):291–301. DOI: 10.1007/s10787-017-0345-0.
25. Ren Z., Gong, H., Zhao A., Zhang J., Yang C., Wang P., Zhang Y. Effect of Sea Buckthorn on Plasma Glucose in Individuals with Impaired Glucose Regulation: A Two-Stage Randomized Crossover Intervention Study. *Foods*. 2021;10(4):804. DOI: 10.3390/foods10040804.
26. Mir M. A., Mir B. A., Singh D., Rao Z. Studies on the Anti-Inflammatory Properties of Various extracts of *Hippophae rhamnoide*. *Journal of pharmacology & clinical research*. 2017;2(2):555584. DOI: 10.19080/JPCR.2017.02.555584.
27. Verma H., Sharma M., Chahota R., Palial A. Assessment of antimycotic activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf exacts against common fungi associated with skin dermatitis. *Vet. World*. 2013;6(4):205–208. DOI: 10.5455/vetworld.2013.205-208.
28. Kramaryov S. O., Yevtushenko V. V., Shadrin V. O., Golovach O. V., Kaminska T. M. Ingestion of *Hippophae rhamnoides* leaf extract in the treatment of chickenpox in children. *Aktual'naa Infektologia*. 2018;6(2):77–82. (In Ukr.) DOI: 10.22141/2312-413x.6.2.2018.131093.
29. Ganju L., Padwad Y., Singh R., Karan D., Chanda S., Chopra M. K., Bhatnagar P., Kashyap R., Sawhney R. C. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International immunopharmacology*. 2005;5(12):1675–1684. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.017.
30. Geetha S., Sai Ram M., Singh V., Ilavazhagan G., Sawhney R. C. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an in vitro study. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(3):373–378. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00406-8.
31. Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Gudkova A. A., Slivkin A. I. Study of Morphological Features of Sea Buckthorn Leaves by Luminescent and Stereomicroscopy Methods. *Drug development & registration*. 2022;11(1):123–131. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131.