United Nations
Educational, Scientific and
Cultural Organization

INTERNATIONAL CENTER FOR CHEMICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES

(H.E.J. Research Institute of Chemistry, and Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research)
University of Karachi, Karachi-75270, Pakistan

Prof. Dr. Muhammad Iqbal Choudhary
Director *Hilal-e-Imtiaz, Sitara-e-Imtiaz, Tamgha-e-Imtiaz*

Distinguished National Professor
D. Sc., Ph.D., C.Chem., Meritorious Professor
Member National Commission for Science and Technology
Fellow of the Academy of Sciences for the Developing World (TWAS)
Fellow of the Islamic World Academy of Sciences
Fellow of the Pakistan Academy of Sciences
Fellow of the Royal Society of Chemistry
Fellow of the Chemical Society of Pakistan
Fellow of International Union of Pure and Applied Chemistry
Fellow of LEAD International
Fellow of the World Innovation Foundation

Tel. Off : (92-21) 34824924-5, 34819010
UAN : 111-222-292 (Ext.106)
Telefax : (92-21) 99261713, 34819018
E-mail : iqbal.choudhary@iccs.edu
pcmd@cyber.net.pk
Web : www.iccs.edu

Review of the foreign scientific adviser to the scientific degree of PhD Candidate

Ikhsanov Yerbol Saginovich

In the course of scientific work, the doctoral student showed himself as a diligent student and enterprising researcher, studied a considerable amount of literature and mastered many methods of analyzing medicinal plant materials and preparations based on it, established trusting relationships with the staff of the center for the period of internship. data interest.

The results were published as articles with a citation index and reported at a number of relevant international conferences.

According to the results of the research, the following conclusions were made:

1) The high quality of medicinal plant materials was determined in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan, harmonized with the European Pharmacopoeia, to medicinal plant raw materials. Medicinal plant raw materials have a moisture content of 8.13%, ash content of 17.12% and the proportion of ash insoluble in 10% of HCI 15.31%, which is quite acceptable for vegetable raw materials harvested in the arid zone.

2) The substance was obtained from the above-ground part of the plant *Tamarix hispida*, the technology of its production, indicators of good quality, the mineral composition and the quantitative composition of the main groups of biologically active substances were tested.

3) In a substance, chromatography-mass spectrometry identified the presence of organohalogen compounds in small amounts: 3-chloropropionic acid heptadecyl ester, fumaric acid 2-chlorophenylethyl ester and 1.54-dibromine tetrapentacontan. Halogen derivatives for the first time found in plants of the genus *Tamaricaceae*. Also for the first time in the over-part of Tamarix hispida, an extract was identified to identify one sulfur-containing compound Spiro (17-acetochindrostan-3-ol) 2.2 '(1', 3'-dicyan), in addition, some alkaloids were identified, in particular 4-t-butyl-2 - (4-methoxy-phenyl) - 6-p-tolyl-pyridine, miorfian-4,6-diol, N-formyl-6-aceate and 7-methyleno [3,2-b] pyridine. Study was made of various types of biological activity of the original phytopreparation: the cytotoxic activity of ethanol extracts, hexane, dichloromethane and chloroform extracts of *Tamarix hispida* was determined, it was revealed that

extracts of *Tamarix hispida* are relatively low-toxic and only 90% of spit extract have significant cyotoxicity. The fungicidal activity of *Tamarix hispida* extracts was determined (there is almost no activity), Insecticidal activity against agricultural pests was also not found, the antibacterial activity of the extracts under study is relatively low, but the extract showed high growth-stimulating activity, especially 70% alcohol extract of *Tamarix hispida* while a positive result is achieved at a concentration of about 10 µL.

4) Obtained 50% extract of *Tamarix hispada* is modified using selectively transforming microorganisms *Cunninghamella blakeleeana* ATCC8688A, *Microphomina phaseoline* KUCC 130, *Fuscasium lini* NRRL 2204, *Glomerella fusarioides* ATCC 9552, *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Cephalosporium aphidicola* ATCC 28300, *Rhizopus stolonifer* TSY 047, *Guoclodium viride* ATCC 10097. Using selective nutrient media. From the solutions obtained after the process of liquid crystallization, it was determined.A comparative analysis of the chemical composition of the initial ethanolic extract of Tamarix hispida and the extract after the biotransformation process was carried out. It was proved that the anti-cancer activity of the extract significantly increased as a result of the impact of the culture of *Glomerella fusarioides* ATCC 9552, the effect of *Fuscasium lini* NRRL 2204, *Rhizopus stolonifer* TSY 047, *Guoclodium viride* ATCC 10097, increases anti-inflammatory ability. Antibacterial activity increases after exposure to *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Cunninghamella blakesleeana* ATCC8688A and *Microphomina phaseoline* KUCC 730. The qualitative and quantitative chemical composition of the obtained extracts was determined, resulting in 16 variants, the total number of identified 260 different compounds. Different types of biological activity of the obtained extracts were determined and a comparative analysis was performed with the initial extract. Prior to biotransformation, the dominant compound in the butanol extract was 3-Forbinopropanoic acid, 9-acetyl-14-ethyl-13,14-dihydro-21- (methoxycarbonyl) - 4,8,13,18-tetramethyl-20-oxo, 3, 7,11,15-tetramethyl-2-hexadecelenyl ether, [3s- [3] and 5 β; -cholan-24-ova acid, 4- (23-carboxy-7,12-dioxo-24-nor-5β; -chloro-3-en-3-yl) - 3,7,12-trioxo-, dimethyl ether in water, after biotransformation there is a significant change in the chemical composition of the extract, classes of compounds that are atypical for this plant species are found, including 3.68% of the substance cercosporin belonging to the class of photoactive toxins in the extract of the bi-transformed *Cunninghamella blakeleeana*. In general, from the data obtained as a result of studying the chemical composition of the extract from the aerial part of *Tamarix hispida* modified by the eight above-listed types of fungi for two periods, we can conclude that after 14 days, most samples are dominated by nitrogen and oxygen containing compounds belonging to the classes of nitrides, amides and nitrites, a certain amount of organic sulfur compounds and, remarkably, silicon of organic compounds were also revealed, this fact can be explained by the peculiarity of the fungi used. These substances promote the addition and oxidation, the high content of organohalogen compounds can be explained by the fact that the initial extract contains a significant amount of salts, which is typical for plants growing in arid zones to which *Tamarix hispida* belongs, moreover, the peculiarity of this plant is the excretion of excess salt through the aerial part, which was used as a medicinal plant material. The absence of organohalogen compounds in the later sample is due to the peculiarities of the composition of the enzymes secreted by the fungi in accordance with the logic of living organisms, promoting reactions towards more biocompatible organo-nitrogen compounds, and in some cases the products of the reactions are organic sulfur and organic compounds. Since sulfur and silicon are in the same group with oxygen and carbon and in some ways are their chemical analogues.

Evaluation of the completeness of the solution of the tasks

Tasks are fully implemented. The dissertation paper presents the results of determining the quality of raw materials, its component composition, the selection of optimal conditions for the production of a substance, works on the selection of optimal microorganisms and biotransformation conditions of the extract to improve its therapeutic efficacy, determined the chemical composition and biological activity of biotransformation products, obtained promising results on increase in anti-cancer and anti-inflammatory activity. As a result, it was found out that the effect of microorganisms on the total 50% ethanolic (EtOH) extract obtained from the aerial part of the *Tamarix hispida* plant in most cases leads to a significant increase in anti-inflammatory activity due to possibly organosulfur compounds and some compounds of the class of alkaloids such as substances like Wilforin belonging to the class of alkaloids and exhibiting antibacterial activity, derivatives of quinoxaline, also showing anti-inflammatory activity and also contained in significant quantities ETS, also a considerable amount of pyridine and pyrimidine derivatives identified as potentially biologically active.

The increase in anticancer activity is probably due to the formation of Gamabufotalina, a substance with antitumor effects.

Thus, we have achieved the main goal of this work, namely, the conditions for increasing the biological activity of the total plant extract by the method of biocatalysis, through exposure to cell cultures, have been identified and worked out.

Mr. Ikhsanov Yerbol doctoral dissertation is an independent and completed scientific work, meets all the requirements independent and completed scientific work, meets all the requirements, the author deserves the Ph. D. degree.

PROF. DR. M. IQBAL CHOUDHARY, *H.I., S.I., T.I.*
Director, ICCBS

Эмблема Эмблема Международного центра химических и биологических наук Эмблема PCMD

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЦЕНТР ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
(Исследовательский институт химии имени Хуссейна Эбрахима Джамаля и Научно-исследовательский центр Молекулярной медицины и лекарственных средств имени Доктора Панджвани)
Университет Карачи, Карачи-75270, Пакистан

Профессор, Доктор Мохамед Икбал Чоудхари
Директор H.I., S.I., T.I.

Почетный профессор
Доктор наук, PhD, Специалист высшей категории, Почетный профессор
Член национальной комиссии по науке и технике
Член Академии наук развивающихся стран
Член Всемирной мусульманской академии наук
Член Академии наук Пакистана
Член Королевского общества химиков
Член Пакистанского химического общества
Член Международного союза теоретической и прикладной химии
Член Всемирного инновационного фонда

Тел.: (92-21) 34824924-5, 34819010
УНД: 111-222-292 (доб. 106)
Факс: (92-21) 99261713-4, 34819018-9
Эл. почта: iqbal.choudhary@iccs.edu
pcmd@cyber.net.pk
Эл. адрес: www.iccs.edu

Отзыв зарубежного научного консультанта на соискание научной степени кандидата PhD Ихсанова Ербола Сагиновича

В ходе научной работы докторант проявил себя прилежным студентом и предприимчивый научным исследователем, изучил значительное количество литературы и освоил множество методов анализа лекарственных растительных материалов и препаратов на их основе, установил доверительные отношения с персоналом центра на период стажировки, и проявил интерес к данным.

Полученные результаты были опубликованы в качестве статей с индексом цитируемости и представлены на ряду соответствующих международных конференциях.

В соответствии с результатами научной работы, были сформулированы следующие выводы:

1) Высокое качество лекарственных растительных материалов определялось в соответствии с требованиями государственной фармакопеи Республики Казахстан, основанная на требованиях Европейской фармакопеи, с лекарственным растительным сырьем. Лекарственное растительное сырье содержит 8,13% влаги, 17,12% золы и доля 10% нерастворимой золы в 15,31% соляной кислоте, что вполне приемлемо для растительного сырья, собранного в засушливой зоне.
2) Было получено вещество из надземной части растения *Tamarix hispada*, были проверены технология его производства, показатели хорошего

качества, состав материала и количественный состав основных групп биологически активных веществ.

3) В веществе, хроматографическая-масс-спектрометрия идентифицировала присутствие органогалогенных соединений в небольших количествах: гептадециловый эфир 3-хлорпропионовой кислоты, 2-хлорфенилэтиловый эфир фумаровой кислоты и 1,54-дибромынтетрапентаконтан. Галогенные производные впервые были обнаружены в растениях рода *Tamaricaceae*. Также впервые в верхней части *Tamarix hispada* был идентифицирован экстракт, идентифицирующий одно серосодержащее спиросоединение (17-ацетохиндростан-3-ол) 2.2 '(1', 3'-дициан), кроме того, некоторые алкалоиды, в частности 4-трет-бутил-2 - (4-ментоксифенил) -6-п-толил-пиридин, миорфин-4,6-диол, N-формил-6-ацетат и 7-метилен [3,2-b] пиридина. Было проведено исследование различных видов биологической активности исходного фитопрепарата: была определена цитотоксическая активность экстрактов этанола, гексана, дихлорметана и хлороформа растения *Tamarix hispada*, было обнаружено, что экстракты *Tamarix hispada* являются относительно малотоксичными и только 90% экстракт слюны имеет значительную цитотоксичность. Определена фунгицидная активность экстрактов *Tamarix hispada* (активность практически отсутствует), инсектицидная активность против сельскохозяйственных вредителей не обнаружена, антибактериальная активность исследуемых экстрактов относительно невелика, но экстракт проявляет высокую активность стимулирования роста, особенно 70% спиртового экстракта *Tamarix hispada*, в то время как положительный результат достигается при концентрации около 10 μL.

4) Полученный 50% экстракт *Tamarix hispada* модифицирован с использованием селективно трансформирующих микроорганизмов *Cunninghamella blakeleeana* ATCC8688A, *Microphomina phaseoline* KUCC 130, *Fuscasium lini* NRRL 2204, *Glomerella fusarioides* ATCC 9552, *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Cephalosporium aphidicola* ATCC 28300, *Rhizopus stolonifer* TSY 047, *Guoclodium viride* ATCC 10097. Определили и использовали селективные питательные среды из растворов, полученных после процесса жидкостной кристаллизации. Проведен сравнительный анализ химического состава исходного спиртового экстракта *Tamarix hispada* и экстракта после процесса биотрансформации. Было доказано, что противоопухолевая активность экстракта значительно возрастает в результате воздействия культуры микроорганизма *Glomerella fusarioides* ATCC 9552, а эффект микроорганизмов *Fuscasium lini* NRRL 2204, *Rhizopus stolonifer* TSY 047, *Guoclodium viride* ATCC 10097, повышает противовоспалительную способность. Антибактериальная активность увеличивается после воздействия *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Cunninghamella blakeleeana* ATCC8688A, и *Microphomina phaseoline* KUCC 730. Также был

определен качественный и количественный химический состав полученных экстрактов, в результате чего было получено 16 вариантов, общее количество идентифицированных составляет 260 различных соединений. Были определены различные виды биологической активности полученных экстрактов и проведен сравнительный анализ с исходным экстрактом. До биотрансформации доминирующим соединением в экстракте бутанола были 3-Форбинопропановая кислота, 9-ацетил-14-этил-13, 14-гидро-21-(метоксикарбонил)-4, 8, 13, 18-тетраметил-20-, 3, 7, 11, 15-тетраметил-2-гексадецелениловый эфир, [3S-[3] и 5β; -холан-24-оновая кислота, 4- (23-карбоксо-7, 12-диоксо-24-нор-5β; -хлоро-3-ен3ил) – 3, 7, 12-триоксо-, диметиловый эфир в воде, после биотрансформации происходит значительное изменение химического состава экстракта. Найдены классы соединений, которые являются нетипичными для этого вида растений, в том числе 3,68% вещества, которое является циркоспорином, принадлежащим к классу фотоактивных токсинов в экстракте би-трансформированной *Cunninghamella blakeleeana*. В целом, по сформированным данным, полученных в результате изучения химического состава экстракта с наземной части *Tamarix hispida*, модифицированного 8 перечисленными выше типами грибков в течение двух периодов, можно сделать вывод, что через 14 дней большинство образцов где преобладают азот и кислородсодержащие соединения, принадлежащие к классам нитридов, амидов и нитритов, определенное количество органических соединений серы и, что замечательно, кремний органических соединений, этот факт можно объяснить особенностью используемых грибков. Эти вещества способствуют добавлению и окислению, высокое содержание органогалогенных соединений можно объяснить тем, что исходный экстракт содержит значительное количество солей, что характерно для растений, растущих в засушливых зонах, к которым относится *Tamarix hispida*, кроме того, особенность этого растения представляет собой выделение избыточной соли через воздушную часть, которая использовалась в качестве лекарственного растительного материала. Отсутствие органогалогенных соединений в более позднем образце обусловлено особенностями состава ферментов, выделяемых грибками в соответствии с логикой живых организмов, способствующими реакциям на более биосовместимые органо-азотные соединения, а в некоторых случаях и продуктами реакциями являются органическая сера и органические соединения. Поскольку сера и кремний находятся в одной группе с кислородом и углеродом, то в некотором смысле являются их химическими аналогами.

Оценка завершенности выполнения требуемых задач.

Задачи были выполнены в полном объеме. В диссертационном исследовании представлены результаты определения качества сырья, его компонентного состава, выбора оптимальных условий для производства

вещества, работы по выбору оптимальных микроорганизмов и условий биотрансформации экстракта для повышения его терапевтической эффективности, определены химический состав и биологическая активность продуктов биотрансформации, получили многообещающие результаты по увеличению противоопухолевой и противовоспалительной активностей. В результате выяснилось, что влияние микроорганизмов на общий 50% экстракт этанола (EtOH), полученный с наземной части растения *Tamarix hispida*, в большинстве случаев приводит к значительному увеличению противовоспалительной активности из-за возможно серосодержащих соединений и некоторых соединений класса алкалоидов, такие вещества, как Вилфолин, принадлежащие к классу алкалоидов и проявляющие антибактериальную активность, производные хиноксалина, также проявляющие противовоспалительную активность, а также содержащиеся в значительных количествах ETS, также значительное количество производных пиридина и пиримидина идентифицированных как потенциально биологически активные.

Увеличение противоопухолевой активности, вероятно, связано с образованием Гаммабуфоталин, вещество с противоопухолевыми эффектами.

Таким образом, мы достигли основной цели этой работы, а именно, определили и разработали условия для увеличения биологической активности общего растительного экстракта методом биокатализа, путем воздействия клеточных культур.

Диссертационная работа г-на Ихсанова Ербола является самостоятельной и завершенной научной работой и соответствует всем необходимым требованиям. Автор заслуживает научной степени доктора Ph.D.

/подпись/

Проф., Доктор Мохаммед Икбал Чоудхари, H.I., S.I., T.I.

Директор международного центра химических и биологических наук

Я, Каленова Айгерим Амангельдиевна, ИИН951006450095, (удостоверение личности №035190560, выдано МВД РК от 17.06.2013г. действительно до 16.06.2023г.), настоящим подтверждаю, что я перевела вышестоящий документ с английского языка на русский язык и что данный перевод является точным переводом данного документа и соответствует содержанию оригинала документа.

Подпись .....

KALENOVA AIGERIM * ПЕРЕВОДЫ * TRANSLATIONS * АУДАРМАЛАР * КАЛЕНОВА АЙГЕРИМ *

«Седьмое» ноября две тысячи восемнадцатого года, я, Муталиева Диляра Рашидовна, нотариус города Алматы, действующий на основании государственной лицензии № 0000252, выданной Комитетом по организации правовой помощи и оказанию юридических услуг населению Министерства Юстиции Республики Казахстан от 03.11.2005 года, свидетельствую подлинность подписи, сделанной переводчиком Каленовой Айгерим Амангельдиевной. Личность подписавшей документ установлена, дееспособность и полномочия её проверены.

Зарегистрировано в реестре за № 8290

Оплачено согласно ст.30, п. 2. Закона РК «О Нотариате»

Нотариус

Пронумеровано и прошнуровано
Нотариус