

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2026

УДК 615.322

DOI 10.59598/ME-2305-6053-2026-120-3-158-165

Д. А. Солянов^{1*}, И. В. Лосева²

ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНАТОРНОГО ПОДХОДА ПРИ КЛОНОГЕННОМ АНАЛИЗЕ ДЛЯ СКРИНИНГА РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

¹Научно-исследовательская лаборатория Института наук о жизни НАО «Медицинский университет Караганды» (100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; e-mail: info@qmu.kz)

²Кафедра фармации НАО «Медицинский университет Караганды» (100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; e-mail: info@qmu.kz)

***Дмитрий Андреевич Солянов** – Научно-исследовательская лаборатория Института наук о жизни НАО «Медицинский университет Караганды»; 100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; e-mail: solyanov@qmu.kz

Цель. Разработка и теоретическое обоснование комбинаторного дизайна клоногенного анализа для оптимизации скрининга растительных экстрактов, а также количественная оценка его эффективности по сравнению с классическим подходом.

Материалы и методы. Выполнено теоретическое моделирование проведения клоногенного анализа для библиотеки из 10 растительных экстрактов с использованием двух клеточных линий рака простаты (DU145 и LNCaP) и трех повторностей. Проведено сравнение классического индивидуального тестирования с предложенным иерархическим комбинаторным дизайном, основанным на последовательном разделении экстрактов на пулы с последующей деконволюцией результатов. Выполнен расчет необходимого числа экспериментальных этапов, планшетов и эффективности каждого подхода.

Результаты и обсуждение. Установлено, что при исследовании 10 растительных экстрактов классический подход требует выполнения 60 планшетов, тогда как применение иерархического комбинаторного дизайна позволяет сократить их количество до 36, что соответствует снижению числа экспериментальных единиц на 40%. Показано, что эффективность предложенного метода возрастает с увеличением объема библиотеки: при анализе 100 образцов экономия достигает 86% по сравнению с традиционным подходом. Предложенная стратегия позволяет сократить расход реагентов, уменьшить продолжительность эксперимента и повысить информационную плотность скрининга без уменьшения числа повторностей и потери статистической надежности результатов. При этом метод наиболее эффективен для выявления наиболее активного экстракта и требует последующей верификации при анализе нескольких активных компонентов или синергетических взаимодействий.

Выводы. Иерархический комбинаторный дизайн представляет собой эффективный инструмент оптимизации клоногенного анализа, позволяющий существенно сократить количество экспериментальных постановок, временные и материальные затраты при сохранении достоверности получаемых результатов. Предложенный подход может быть использован в качестве этапа первичного высокопроизводительного скрининга растительных экстрактов и других биологически активных соединений с последующим проведением детализированных исследований наиболее перспективных образцов.

Ключевые слова: клоногенный анализ; комбинаторный дизайн; пулинг; высокопроизводительный скрининг; растительные экстракты; цитотоксичность; фитохимический скрининг

ВВЕДЕНИЕ

Скрининг биоактивных соединений природного происхождения является ключевым этапом в разработке новых терапевтических агентов. Традиционно такие исследования проводятся путем индивидуального тестирования экстрактов или соединений, что, несмотря на высокую точность, характеризуется значительными временными и ресурсными затратами.

Показательным примером является масштабное исследование I. B. Suffredini et al., посвященное скринингу растительных экстрактов Амазонского региона [1]. В рамках данного проекта было протестировано 2 280 экстрактов, полученных из 139 видов растений, с целью выявления антимикробной активности. Несмотря на высокую научную ценность результатов, данная работа заняла около 15 лет, что наглядно демонстрирует

Таблица 1 – Возможные варианты анализа нескольких экстрактов, их преимущества и недостатки.

Подход	Преимущества	Недостатки	Примеры исследований
Одиночный экстракт	Простота, легкая деконволюция	Медленный (мало индексирован), ресурсоемкий	Стандартный HTS
Смешанный пул (пулинг)	Ускоряет скрининг (до N-раз), экономия реагентов	Маскирование активности, требует последующей деконволюции	B. Castillo et al. [2]
Mixture-дизайн (DoE)	Оптимизация пропорций, улавливает взаимодействия	Сложнее планировать, нужен статистический анализ	M. Nouioua et al. [4]
Библиотека фракций (prefractionated)	Чистота компонентов, меньше интерференций	Дорогая/долгая подготовка фракции, упрощение химического анализа	Обзор HTS NP [7]

ограниченную эффективность классического подхода, основанного на последовательном тестировании индивидуальных образцов.

Основной причиной столь значительных временных затрат является использование традиционной стратегии скрининга, при которой каждый экстракт анализируется отдельно, без применения методов повышения пропускной способности. Такой подход не учитывает возможности современных технологий, направленных на ускорение отбора биологически активных соединений, включая высокопроизводительный скрининг, комбинаторные методы, *in silico* – моделирование и автоматизацию. В условиях роста объема исследуемых природных библиотек становится очевидной необходимость перехода к более эффективным стратегиям, позволяющим существенно сократить время и ресурсы, затрачиваемые на первичный скрининг.

Современные тенденции в области высокопроизводительного скрининга (High-Throughput Screening (HTS)) направлены на повышение информационной плотности экспериментов. Одним из наиболее перспективных подходов является использование комбинаторных стратегий, основанных на объединении нескольких образцов в рамках одного теста (пулинг) и последующей деконволюции результатов.

Интерес к подобным подходам обусловлен тем, что природные продукты изначально представляют собой сложные смеси соединений, и их биологическая активность часто определяется совокупным действием компонентов. В ряде исследований показано, что использование смешанных библиотек экстрактов позволяет не только ускорить скрининг, но и выявлять синергетические эффекты, недоступные при индивидуальном тестировании [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Основные подходы представлены в таблице 1.

Так, в работе B. Castillo et al. было продемонстрировано, что объединение до 6 экстрактов в одной лунке не приводит к потере воспроиз-

димости результатов ($Z' \approx 0.6$), что подтверждает применимость пулинг-подхода для HTS [2]. В исследовании A. Rodriguez et al. выявлено, что около 22% комбинаций растительных экстрактов проявляют синергетические или аддитивные эффекты, что подчеркивает важность анализа смесей [3]. M. Nouioua et al. показали, что оптимизация состава смеси с использованием симплекс-решетчатого плана позволяет достичь максимальной биологической активности за счет взаимодействия компонентов [4].

Клоногенный (колониообразующий) анализ является одним из золотых стандартов оценки долгосрочной выживаемости клеток после воздействия цитотоксических факторов, включая химиотерапевтические препараты и ионизирующее излучение. Его принцип основан на способности отдельной жизнеспособной клетки после обработки сформировать колонию, состоящую как минимум из 50 клеток, что соответствует приблизительно 5-6 циклам деления [9, 10]. Метод важен тем, что позволяет выявлять как непосредственную клеточную гибель, так и репродуктивную гибель: состояние, при котором клетки сохраняют метаболическую активность, но утрачивают способность к пролиферации. Подробные протоколы выполнения анализа, включая этапы подготовки клеток, инкубации и окрашивания, представлены, в частности, в работе X. Yang et al. [9], основанной на классической методике N. A. Franken et al. [10].

При клоногенном анализе необходимо учитывать ряд критически важных факторов, влияющих на воспроизводимость и точность результатов. Прежде всего, выбор клеточной модели играет ключевую роль: обычно используются опухолевые линии, такие как HCT-116, MCF-7 или HepG2, в сочетании с нормальными клетками (например, фибробластами или эпителиальными клетками) для оценки селективности действия исследуемых соединений. Такой подход позволяет рассчитывать индекс селективности, как это пока-

зано в работе А. Н. Alghamdi et al., где в качестве контроля использовалась линия MRC-5 [12].

Не менее важным этапом является подготовка клеток к посеву. Клетки диссоциируют до состояния одиночных клеток, как правило с использованием трипсина и EDTA, после чего высеивают при крайне низкой плотности (обычно 50-200 клеток на лунку в 6-луночной планшете) [13]. Это необходимо для обеспечения того, чтобы каждая сформировавшаяся колония происходила из одной исходной клетки. Плотность посева требует тщательной оптимизации, поскольку избыточная плотность приводит к слиянию колоний, а низкая плотность повлияет на получаемый результат.

После инкубации, которая обычно продолжается 10-14 сут, колонии фиксируют и окрашивают, чаще всего с использованием кристаллического фиолетового, а затем проводят их подсчет – вручную или с применением автоматизированных систем. Стандартным критерием считается наличие не менее 50 клеток в одной колонии [9, 11]. Основным количественным показателем является доля выживших клеток, которая рассчитывается как отношение числа колоний после обработки к посадочной эффективности контрольной группы. Такой подход позволяет учитывать различия в исходной способности клеток к образованию колоний [14].

Несмотря на высокую информативность метода, клонотипный анализ сопряжен с рядом технических сложностей. Одной из распространенных проблем является агрегация клеток, приводящая к искажению результатов подсчета. Кроме того, критическое значение имеет выбор времени инкубации: недостаточная продолжительность может привести к недоразвитию колоний, при долгой инкубации могут образоваться вторичные скопления клеток. Дополнительным фактором является эффект клеточного взаимодействия, при котором при высокой плотности посева клетки могут стимулировать рост друг друга, что снижает точность оценки посадочной эффективности. Для минимизации этих эффектов рекомендуется оптимизировать условия посева, использовать автоматизированные методы подсчета и строго контролировать параметры культивирования.

Учитывая высокую трудоемкость, строгость параметров культивирования и экономические затраты клонотипного анализа, важно оптимизировать данную методику, по возможности ускоряя и удешевляя ее при больших объемах исследуемых объектов. В будущем мы планируем тестировать экстракты на наличие цитотоксичности. Учитывая, что нас не интересует механизм или иные биологические свойства получаемых экстрактов, важно организовать пулинг таким образом, чтобы уменьшить количество используемого расходного материала и ускорить проведение методики. Путем подсчета колоний и выбора наиболее активного пула можно найти экстракт с самой высокой

цитотоксичностью, а также оценить избирательность полученных экстрактов.

Цель работы – разработка и теоретическое обоснование комбинаторного дизайна клонотипного анализа, а также количественная оценка выигрыша по сравнению с классическим подходом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе рассмотрен модельный эксперимент, включающий в себя библиотеку из десяти растительных экстрактов ($N=10$), две клеточные линии рака простаты DU145 и LNCaP ($L=2$) и проведение клонотипного анализа с использованием триплетов ($r=3$). При классическом подходе общее число тестов определяется произведением числа образцов, числа линий и числа повторений по формуле:

$$N_i = N \times L \times r \quad (1).$$

Подстановка значений дает 60 планшетов, необходимых для постановки эксперимента на экстракт каждого растения триплетами на две линии рака. В условиях эксперимента на дополнительных линиях рака молочной железы, как мы планируем в будущем, количество необходимых планшетов может возрасти до 120.

В качестве альтернативы предложен иерархический (дихотомический) комбинаторный дизайн. На первом этапе все 10 экстрактов делятся на два пула по пять образцов ($P1: E1 - E5$ и $P2: E6 - E10$), которые тестируются в заданных условиях. По результатам выбирается более активный пул, который на следующем этапе делится на два подпула (например, 2 и 3 экстракта), после чего процедура повторяется до локализации одного наиболее активного экстракта. Наш итоговый процесс состоит из трех последовательных этапов разбиения. При этом расчет количества необходимых этапов осуществляется по формуле:

$$\log_2 P(n) \quad (2),$$

где P – количество пулов, используемых исследователем, а n – количество образцов. Таким образом для расчета необходимого количества этапов для 100 образцов при условии разделения их на две смеси по 50 образцов в каждом, получаем формулу $\log_2(100) = 7$ этапов.

Число тестов на каждом этапе определяется как

$$N_{\text{stage}} = P \times L \times r \quad (3),$$

где P – количество пулов, L – количество клеточных линий и r – количество повторений. Суммарное число тестов для трех этапов составляет:

$$N_{\text{total}} = 3 \times (2 \times L \times r) \quad (4).$$

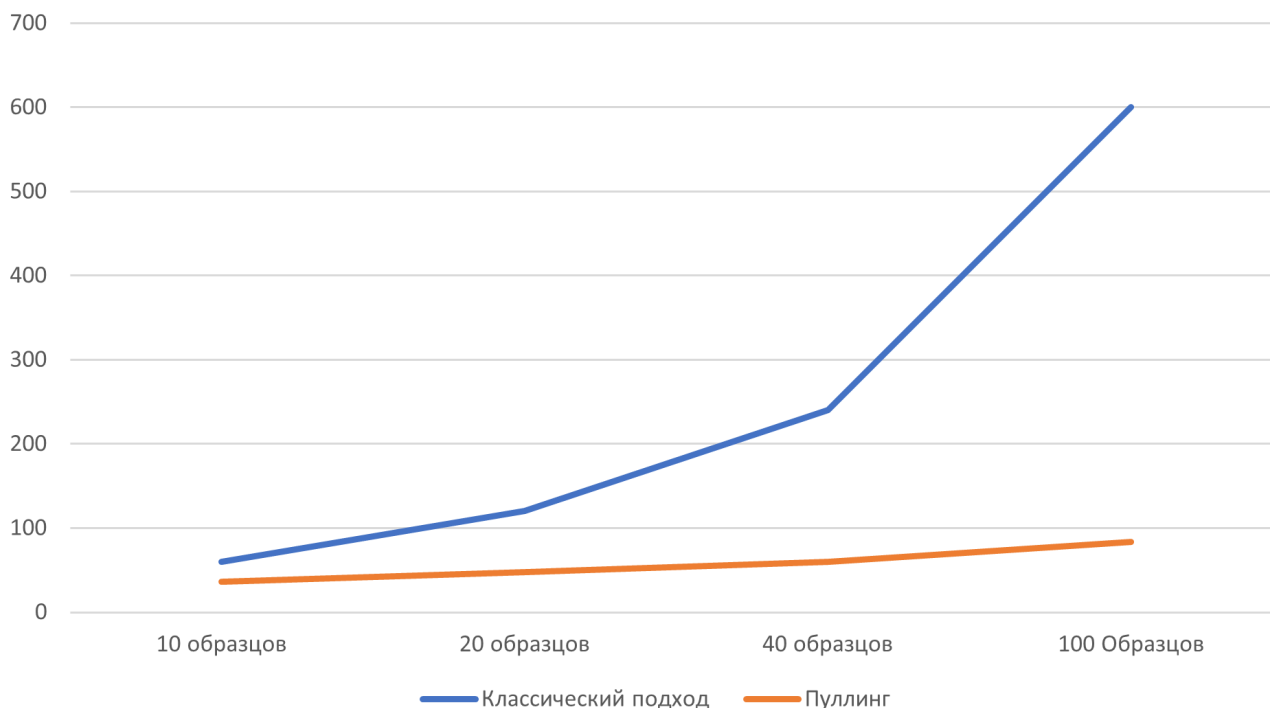


Рисунок 1 – Зависимость эффективности комбинаторного метода от количества образцов

При $L=2$ и $r=3$ это дает 36 планшетов для тестирования двух клеточных линий. Мы не уменьшаем число повторений, но уменьшаем количество условий, достигая оптимизации.

Эффективность метода оценивается как отношение числа тестов (или планшетов) при классическом подходе к соответствующему числу при комбинаторном дизайне. При необходимости может учитываться дополнительный этап верификации (деконволюции) для подтверждения результатов на уровне отдельных экстрактов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен сравнительный анализ классического и иерархического комбинаторного подходов. При индивидуальном тестировании всех экстрактов в триплетах общее число экспериментальных единиц составляет 60 планшетов. Предложенный иерархический дизайн требует выполнения 3 последовательных этапов, на каждом из которых тестируются два пула, что суммарно приводит к 36 планшетам.

Таким образом, использование иерархического подхода позволяет снизить количество планшетов на 40% по сравнению с классическим дизайном. При этом преимущество подобного подхода начинает проявляться с увеличением количества образцов для скрининга, что продемонстрировано на рисунке 1.

В то время как количество используемых планшетов при использовании метода двух пу-

лов остается прежним, эффективность начинает резко возрастать с увеличением количества образцов. Так, при 100 образцах пуллинг становится эффективнее уже на 86%, что почти в 2 раза эффективнее по сравнению с 10 образцами.

Интерпретация результатов показывает, что предложенный подход эффективен для задач, ориентированных на выявление доминирующего по активности экстракта. При этом метод не предназначен для выявления множественных активных компонентов или анализа синергетических взаимодействий, что следует учитывать при планировании дальнейших этапов исследования. В целом, полученные оценки демонстрируют практическую применимость иерархического комбинаторного дизайна для оптимизации скрининговых экспериментов с ограниченными ресурсами или временем.

С точки зрения практического применения данного метода, снижение числа планшетов приводит к уменьшению расхода реагентов, сокращению времени посева и обработки и общему ускорению времени проведения эксперимента. В условиях клоногенного анализа, где эксперимент длится 1-2 недели, это особенно важно при соблюдении строгих временных рамок.

В случае использования методов, где важна оценка каждого отдельного образца, а не нахождение наиболее сильного эффекта, перспективным остаётся применение алгоритмических методов (MAPS, CRowS) и машинного обучения для повышения точности деконволюции.

ВЫВОДЫ

1. Комбинаторные подходы, рассматриваемые в работе, демонстрируют значительный потенциал для оптимизации биологических экспериментов, особенно в условиях высокой трудоемкости и длительности клонированного анализа. Проведенный теоретический анализ показал, что переход от классического индивидуального тестирования экстрактов к иерархическому комбинаторному дизайну позволяет существенно снизить количество необходимых экспериментальных единиц без потери статистической надежности результатов. В частности, для модельной системы из 10 экстрактов показано снижение числа используемых планшетов с 30 до 18, что соответствует экономии порядка 40%. При увеличении числа исследуемых образцов данный эффект становится еще более выраженным, что делает предложенный подход особенно актуальным для масштабных фитохимических скринингов.

2. Принципиально важно, что достигнутая оптимизация основана не на снижении числа повторений, а на уменьшении количества тестируемых условий за счет рациональной организации эксперимента. Это позволяет сохранить достоверность результатов и корректность статистической интерпретации, что является критическим требованием при работе с биологическими системами. Таким образом, комбинаторный подход можно рассматривать как инструмент повышения информационной плотности эксперимента, при котором каждая постановка дает большее количество значимой информации по сравнению с классическим дизайном.

3. Дополнительным преимуществом предложенной стратегии является сокращение временных затрат на проведение эксперимента. Так как клонированный анализ, в среднем, требует длительного периода инкубации (до 10-14 сут), уменьшение числа параллельных постановок приводит к существенному ускорению всего исследовательского цикла. Это особенно важно при работе с несколькими клеточными линиями или при расширении эксперимента на дополнительные модели опухолей, где затраты времени и ресурсов возрастают пропорционально числу условий.

4. В то же время необходимо отметить ограничения предложенного подхода. Иерархический дизайн ориентирован преимущественно на выявление наиболее активного компонента и не позволяет в полной мере анализировать синергетические или антагонистические взаимодействия между экстрактами. В связи с этим его применение целесообразно рассматривать как этап первичного скрининга, за которым должны следовать более детализированные исследования, включая индивидуальное тестирование и анализ комбинаций. В этом контексте перспективным направле-

нием является сочетание иерархического подхода с более сложными методами пулинга, а также использование алгоритмических стратегий деконволюции и методов машинного обучения.

5. В целом, предложенный подход представляет собой простое и воспроизводимое решение, которое может быть легко внедрено в лабораторную практику без необходимости значительных технологических изменений. Его применение позволяет не только сократить затраты ресурсов и времени, но и повысить общую эффективность исследовательского процесса. Это делает комбинаторные стратегии перспективным инструментом для дальнейшего развития фитохимических и биомедицинских исследований, направленных на поиск новых противоопухолевых агентов.

Вклад авторов:

Д. А. Солянов, И. В. Лосева – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста.

Д. А. Солянов – редактирование.

Конфликт интересов:

Конфликт интересов не заявлен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Suffredini I.B., Silva J.S., Frana S.A., Pinto K.C., Bento K.C.D., Rudiger E.C., Belo P.K.S., de Arruda J.R., Schulze J.P., de Castilho A.L., Camargo L.R.P., Paulino R.O., Santos Y.O., Moraes R.A.L., Maldonado K.C.C., Kolndorfer G., da Silva K., de Jesus P.D., Moura G.O., Brandão V.R., Ribeiro H.A., Vara C.H.K., Massola F., Díaz I.E.C., Paciencia M.L.B., Coutinho S.D., Younes R.N., Varella A.D. Screening Amazon rainforest plant extracts for antimicrobial activity: a 15-year commitment to the Brazilian biodiversity. *Front Antibiot.* 2023; 2: 1122400. <https://doi.org/10.3389/frabi.2023.1122400>
2. Castillo B., Pörzgen P., Penner R., Horgen F.D., Fleig A. Development and optimization of a high-throughput bioassay for TRPM7 ion channel inhibitors. *J. Biomol. Screen.* 2010; 15 (5): 498-507. <https://doi.org/10.1177/1087057110368294>
3. Rodriguez M.V., Sortino M.A., Ivancovich J.J., Pellegrino J.M., Favier L.S., Raimondi M.P., Gattuso M.A., Zacchino S.A. Detection of synergistic combinations of Baccharis extracts with terbinafine against *Trichophyton rubrum* with high throughput screening synergy assay (HTSS) followed by 3D graphs. Behavior of some of their components. *Phytomedicine.* 2013; 20 (13): 1230-1239. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.015>
4. Nouioura G., Tourabi M., El Ghouizi A., Kara M., Assouguem A., Saleh A., Kamaly O.A., El Ouadrhiri F., Lyoussi B., Derwich E.H. Optimization of a New Antioxidant Formulation Using a Simplex Lattice Mixture Design of *Apium graveolens* L.,

Coriandrum sativum L., and Petroselinum crispum M. Grown in Northern Morocco. *Plants (Basel)*. 2023; 12 (5): 1175. doi: <https://doi.org/10.3390/plants12051175>

5. Santos R.G., Giulianotti M.A., Dooley C.T., Pinilla C., Appel J.R., Houghten R.A. Use and implications of the harmonic mean model on mixtures for basic research and drug discovery. *ACS Comb Sci*. 2011; 13 (3): 337-344. <https://doi.org/10.1021/co100065a>

6. Smucker B.J., Brennan B., Rego E., Wu M., Lin Zh., Ahmer B.M.M., Peterson B.R. Design and Analysis Strategies for Pooling in High Throughput Screening: Application to the Search for a New Anti-Microbial. *arXiv*. 2026: 2602.16616v1. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2602.16616>

7. Ayon N.J. High-Throughput Screening of Natural Product and Synthetic Molecule Libraries for Antibacterial Drug Discovery. *Metabolites*. 2023; 13 (5): 625. <https://doi.org/10.3390/metabo13050625>

8. Ramos M., Camel V., Le Roux E., Farah S., Cladiere M. Effect of different pooled qc samples on data quality during an inter-batch experiment in untargeted UHPLC-HRMS analysis on two different MS platforms. *Anal. Bioanal. Chem*. 2025; 417 (2): 311-321. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05646-6>

9. Yang X. Clonogenic Assay. *Bio-protocol*. 2012; 2 (10): e187. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.187>

10. Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc*. 2006; 1 (5): 2315-2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

11. Kalvelytė A.V., Imbrasaitė A., Krestnikova N., Stulpinas A. Chapter Four – Adult Stem Cells and Anticancer Therapy. *Advances in Molecular Toxicology*. 2017; 11: 123-202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812522-9.00004-X>

12. Alghamdi A.H., Ahmed A.A.E., Bashir M., Abdalgadir H., Khalid A., Abdallah M.E., Almainani R., Refaat B., Abdalla A.N. Cytotoxic activity, selectivity, and clonogenicity of fruits and resins of Saudi medicinal plants against human liver adenocarcinoma. *Drug. Target. Insights*. 2024; 18: 84-93. <https://doi.org/10.33393/dti.2024.3169>

13. Kumar M., Nassour-Caswell L.C., Alrefai H., Anderson J.C., Schanel T.L., Hicks P.H., Cardan R., Willey C.D. A High-Throughput Neurosphere-Based Colony Formation Assay to Test Drug and Radiation Sensitivity of Different Patient-Derived Glioblastoma Lines. *Cells*. 2024; 13 (23): 1995. <https://doi.org/10.3390/cells13231995>

14. Fladerer J.-P., Grollitsch S., Bucar F. SMS: A new screening method for synergism to test multi-herbal drug interactions for their antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters*. 2023; 57: 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.08.016>

ТРАНСЛИТЕРАЦИЯ

1. Suffredini I.B., Silva J.S., Frana S.A., Pinto K.C., Bento K.C.D., Rudiger E.C., Belo P.K.S., de Arruda J.R., Schulze J.P., de Castilho A.L., Camargo L.R.P., Paulino R.O., Santos Y.O., Morais R.A.L., Maldonado K.C.C., Kolndorfer G., da Silva K., de Jesus P.D., Moura G.O., Brandão V.R., Ribeiro H.A., Vara C.H.K., Massola F., Díaz I.E.C., Paciencia M.L.B., Coutinho S.D., Younes R.N., Varella A.D. Screening Amazon rainforest plant extracts for antimicrobial activity: a 15-year commitment to the Brazilian biodiversity. *Front Antibiot*. 2023; 2: 1122400. <https://doi.org/10.3389/frabi.2023.1122400>

2. Castillo B., Pörzgen P., Penner R., Horgen F.D., Fleig A. Development and optimization of a high-throughput bioassay for TRPM7 ion channel inhibitors. *J. Biomol. Screen*. 2010; 15 (5): 498-507. <https://doi.org/10.1177/1087057110368294>

3. Rodriguez M.V., Sortino M.A., Ivancovich J.J., Pellegrino J.M., Favier L.S., Raimondi M.P., Gattuso M.A., Zacchino S.A. Detection of synergistic combinations of Baccharis extracts with terbinafine against Trichophyton rubrum with high throughput screening synergy assay (HTSS) followed by 3D graphs. Behavior of some of their components. *Phytomedicine*. 2013; 20 (13): 1230-1239. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.015>

4. Nouioura G., Tourabi M., El Ghouizi A., Kara M., Assouguem A., Saleh A., Kamaly O.A., El Ouadrhiri F., Lyoussi B., Derwich E.H. Optimization of a New Antioxidant Formulation Using a Simplex Lattice Mixture Design of Apium graveolens L., Coriandrum sativum L., and Petroselinum crispum M. Grown in Northern Morocco. *Plants (Basel)*. 2023; 12 (5): 1175. doi: <https://doi.org/10.3390/plants12051175>

5. Santos R.G., Giulianotti M.A., Dooley C.T., Pinilla C., Appel J.R., Houghten R.A. Use and implications of the harmonic mean model on mixtures for basic research and drug discovery. *ACS Comb Sci*. 2011; 13 (3): 337-344. <https://doi.org/10.1021/co100065a>

6. Smucker B.J., Brennan B., Rego E., Wu M., Lin Zh., Ahmer B.M.M., Peterson B.R. Design and Analysis Strategies for Pooling in High Throughput Screening: Application to the Search for a New Anti-Microbial. *arXiv*. 2026: 2602.16616v1. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2602.16616>

7. Ayon N.J. High-Throughput Screening of Natural Product and Synthetic Molecule Libraries for Antibacterial Drug Discovery. *Metabolites*. 2023; 13 (5): 625. <https://doi.org/10.3390/metabo13050625>

8. Ramos M., Camel V., Le Roux E., Farah S., Cladiere M. Effect of different pooled qc samples on data quality during an inter-batch experiment in untargeted UHPLC-HRMS analysis on two different MS platforms. *Anal. Bioanal. Chem*. 2025; 417

(2): 311-321. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05646-6>

9. Yang X. Clonogenic Assay. *Bio-protocol*. 2012; 2 (10): e187. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.187>

10. Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (5): 2315-2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

11. Kalvelytė A.V., Imbrasaitė A., Krestnikova N., Stulpinas A. Chapter Four – Adult Stem Cells and Anticancer Therapy. *Advances in Molecular Toxicology*. 2017; 11: 123-202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812522-9.00004-X>

12. Alghamdi A.H., Ahmed A.A.E., Bashir M., Abdalgadir H., Khalid A., Abdallah M.E., Almaini R., Refaat B., Abdalla A.N. Cytotoxic activity, selectivity, and clonogenicity of fruits and

resins of Saudi medicinal plants against human liver adenocarcinoma. *Drug. Target. Insights*. 2024; 18: 84-93. <https://doi.org/10.33393/dti.2024.3169>

13. Kumar M., Nassour-Caswell L.C., Alrefai H., Anderson J.C., Schanel T.L., Hicks P.H., Cardan R., Willey C.D. A High-Throughput Neurosphere-Based Colony Formation Assay to Test Drug and Radiation Sensitivity of Different Patient-Derived Glioblastoma Lines. *Cells*. 2024; 13 (23): 1995. <https://doi.org/10.3390/cells13231995>

14. Fladerer J.-P., Grollitsch S., Bucar F. SMS: A new screening method for synergism to test multi-herbal drug interactions for their antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters*. 2023; 57: 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.08.016>

Поступила 06.02.2026

Направлена на доработку 27.04.2026

Принята 23.07.2026

Опубликована online 30.09.2026

D. A. Solyanov^{1*}, I. V. Loseva²

APPLICATION OF A COMBINATORIAL APPROACH IN CLONOGENIC ASSAY FOR PLANT EXTRACT SCREENING

¹Research Laboratory, Institute of Life Sciences, NC JSC «Karaganda Medical University» (100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda c., Gogolya str.,40; e-mail: info@qmu.kz)

²Department of Pharmacy, NC JSC «Karaganda Medical University» (100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda c., Gogolya str.,40; e-mail: info@qmu.kz)

***Dmitry Andreevich Solyanov** – Research Laboratory, Institute of Life Sciences, NC JSC «Karaganda Medical University»; 100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda c., Gogolya str.,40; e-mail: solyanov@qmu.kz

Aim. To develop and theoretically validate a combinatorial clonogenic assay design for optimizing the screening of plant extracts and to quantitatively evaluate its efficiency compared with the conventional approach.

Materials and methods. A theoretical model of a clonogenic assay was developed for a library of 10 plant extracts using two prostate cancer cell lines (DU145 and LNCaP) with three biological replicates. The conventional individual screening approach was compared with a hierarchical combinatorial design based on sequential pooling of extracts followed by deconvolution of positive pools. The required number of experimental stages, culture plates, and the overall efficiency of both approaches were calculated.

Results and discussion. The conventional approach required 60 culture plates to evaluate 10 plant extracts, whereas the proposed hierarchical combinatorial design reduced this number to 36 plates, corresponding to a 40% reduction in experimental workload. The efficiency of the proposed method increased with library size, reaching an 86% reduction in the number of experimental units when screening 100 samples. The proposed strategy decreases reagent consumption, shortens experimental time, and increases screening efficiency while maintaining the number of replicates and statistical reliability. The method is particularly effective for identifying the most active extract but requires subsequent validation when multiple active compounds or synergistic interactions are expected.

Conclusions. The hierarchical combinatorial design is an effective approach for optimizing clonogenic assays by substantially reducing the number of experimental procedures, time, and material costs while preserving the reliability of the obtained results. This strategy can be applied as a primary high-throughput screening tool for plant extracts and other biologically active compounds before detailed validation studies.

Key words: clonogenic assay; combinatorial design; pooling; high-throughput screening; plant extracts; cytotoxicity; phytochemical screening

Д. А. Солянов^{1*}, И. В. Посева²

ӨСІМДІК ЭКСТРАКТИЛЕРІН СКРИНИНГТЕУ КЕЗІНДЕ КЛОНОГЕНДІК ТАЛДАУДА КОМБИНАТОРЛЫҚ ТӘСІЛДІ ҚОЛДАНУ

¹Өмір туралы ғылымдар институтының ғылыми-зерттеу зертханасы, «Қарағанды медицина университеті» КеАҚ (100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: info@qmu.kz)

²Фармация кафедрасы, «Қарағанды медицина университеті» КеАҚ (100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: info@qmu.kz)

***Дмитрий Андреевич Солянов** – Өмір туралы ғылымдар институтының ғылыми-зерттеу зертханасы, «Қарағанды медицина университеті» КеАҚ; 100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: solyanov@qmu.kz

Зерттеудің мақсаты. Өсімдік экстрактілерін скринингтеуді оңтайландыру үшін клоногендік талдаудың комбинаторлық дизайнын әзірлеу және теориялық тұрғыдан негіздеу, сондай-ақ оның тиімділігін дәстүрлі әдіспен салыстырмалы түрде бағалау.

Материалдар және әдістер. DU145 және LNCaP қуықасты безі обырының екі жасушалық желісін және үш биологиялық қайталанымды пайдалана отырып, 10 өсімдік экстрактісінен тұратын кітапхана үшін клоногендік талдаудың теориялық моделі жасалды. Дәстүрлі жеке скрининг әдісі экстрактілерді кезең-кезеңімен пулдарға біріктіруге және оң нәтижелерді кейінгі деконволюциялауға негізделген иерархиялық комбинаторлық дизайнмен салыстырылды. Екі тәсіл үшін эксперименттік кезеңдердің, планшеттердің саны және жалпы тиімділігі есептелді.

Нәтижелері және талқылау. 10 өсімдік экстрактісін зерттеу кезінде дәстүрлі әдіс 60 планшетті қажет етсе, ұсынылған иерархиялық комбинаторлық дизайн бұл көрсеткішті 36 планшетке дейін азайтып, эксперименттік көлемді 40%-ға қысқартты. Кітапхана көлемі ұлғайған сайын ұсынылған әдістің тиімділігі артып, 100 үлгіні скринингтеу кезінде эксперименттік бірліктер санының 86%-ға қысқаруына мүмкіндік беретіні көрсетілді. Ұсынылған стратегия реагенттер шығынын азайтады, зерттеу уақытын қысқартады және қайталанымдар саны мен статистикалық сенімділікті сақтай отырып, скринингтің тиімділігін арттырады. Әдіс ең белсенді экстрактіні анықтауда тиімді болғанымен, бірнеше белсенді қосылыс немесе синергиялық әсер күтілетін жағдайда қосымша растауды талап етеді.

Қорытынды. Иерархиялық комбинаторлық дизайн клоногендік талдауды оңтайландырудың тиімді тәсілі болып табылады және эксперименттер санын, уақыт пен материалдық шығындарды едәуір азайтуға мүмкіндік береді, сонымен қатар алынған нәтижелердің сенімділігін сақтайды. Ұсынылған тәсілді өсімдік экстрактілері мен басқа да биологиялық белсенді қосылыстарды егжей-тегжейлі зерттеуге дейінгі бастапқы жоғары өнімді скрининг кезеңінде қолдануға болады.

Кілт сөздер: клоногендік талдау; комбинаторлық дизайн; пулдау; жоғары өнімді скрининг; өсімдік экстрактілері; цитоуыттылық; фитохимиялық скрининг