

СТРУКТУРНІ ДЕТЕРМІНАНТИ КАТАЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ РОСЛИННИХ ГІСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ

М.М. СТИХИЛЯС *, О.В. РАЄВСЬКИЙ, Я.Б. БЛЮМ **

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
вул. Байди-Вишневецького, 2А, Київ, Україна, 04123

E-mail: * stihilia@gmail.com; ** cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

У даній роботі проведено порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей та доменної організації гістондеацетилаз (HDACs) *Arabidopsis thaliana* і *Oryza sativa*, визначено наявність експериментально встановлених просторових структур та якостей прогнозованих моделей. Результати аналізу зв'язування інгібіторів деацетилаз різних класів засвідчили їх обмежену селективність щодо рослинних HDACs. Помітна селективність інгібування спостерігалась для SAHA, тоді як трихостатин А, бутират натрію та циклічні похідні гідроксамових кислот діяли переважно як рапHDACis (від HDACs inhibitors). Показано, що бутират натрію здатний зв'язуватися в каталітичній кишені деацетилаз, однак його взаємодія є нестабільною та, ймовірно, викликає інгібування за рахунок індукції конформаційних змін. В ході структурного аналізу детально охарактеризовано спільні та відмінні риси, характерні для розглянутих гістондеацетилаз. Встановлено, що HDAC10 *O. sativa* має найбільшу структурну подібність до HDA14 *A. thaliana*, що може вказувати на потенційно подібну функціональну роль та спільні субстрати деацетилювання. Встановлено чотири ключові амінокислотні залишки, необхідні для координації Zn^{2+} в активному центрі, зокрема мотив 'XDXH', критично важливий для прояву каталітичної активності. Отримані результати поглиблюють розуміння структурної організації рослинних HDACs, визначають ключові детермінанти їх каталітичної активності та створюють підґрунтя для створення селективних інгібіторів і розроблення біотехнологічних стратегій регуляції росту та підвищення стійкості рослин до стресів.

Ключові слова: гістондеацетилази, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, множинне структурне вирівнювання, молекулярний докінг, інгібітори, каталітична кишеня, хелатуючі властивості, селективність.

Вступ. Гістондеацетилази (HDAC/HDA) є ключовими регуляторами епігенетичних процесів у еукаріотів, які контролюють стан активності хроматину шляхом видалення ацетильних груп

із залишків лізину гістонів (Luo et al., 2020). У *Arabidopsis thaliana* налічується щонайменше 18 гістондеацетилаз, з яких 12 належать до еволюційно консервативного типу RPD3/HDA1, що поділяються на три класи (Luo et al., 2020). Незважаючи на загальну подібність з тваринними гомологами, рослинні гістондеацетилази демонструють унікальні функціональні особливості та структурну різноманітність, які залишаються недостатньо охарактеризованими (Kim et al., 2024; Rayevsky et al., 2019).

Гістондеацетилази беруть участь у регуляції ембріогенезу та онтогенезу рослин, формування стовбурових клітин, старіння, фотоморфогенезу та стресових відповідей. Зокрема, деацетилази HDA6 і HDA19 ефективно пригнічують ембріональні ознаки після проростання насіння, знижуючи рівні експресії транскрипційних факторів LEC1, FUS3 та ABI3 у *A. thaliana* (Tanaka et al., 2008). Деацетилаза HDA19 *A. thaliana* також регулює термоморфогенез у антагоністичному зв'язку з транскрипційним фактором HY5 та гістонацетильтрансферазою GCN5 (Perrella and Kaiserli, 2021), тоді як HDA15 *A. thaliana* діє як негативний регулятор цього процесу та репресує світлочутливі гени в темряві, рекрутуючись факторами транскрипції PIF1 і PIF3 (Yuan et al., 2023; Luo et al., 2020). Деацетилаза HDA9 у комплексі з білками POWERDRESS та HOS15 регулює видовження гіпокотилів і відповідь на короткий фотоперіод у *A. thaliana* (de Rooij et al., 2020). Гістондеацетилази також залучені до гормональних сигнальних шляхів, таких як каскади жасмонової кислоти та ауксину, зокрема через взаємодію з COI1 або модуляцію генів YUC8, ARF і LBD (Zhou et al., 2005; Hoermayer et al., 2024).

Унікальний інтерес становить багатофункціональний білок HDC1, який посилює дію гістондеацетилаз і модулює відповідь на сольо-

вий стрес через вплив на гени LEA і MAF5 (Castaco-Miquel et al., 2024). У контексті стресів гістондеацетилази діють як ко-регулятори з іншими епігенетичними факторами, включно з гістоном H3K27me3 (Castaco-Miquel et al., 2024). Крім того, окремі гістондеацетилази, такі як HDA14, локалізуються в хлоропластах, регулюючи фотосинтетичні процеси (Hartl et al., 2017). Зокрема, HDA14 регулює активність Рубіско через деацетилювання активази Рубіско, що змінює фотосинтетичну ефективність у відповідь на освітлення (Hartl and Finkemeier, 2012), а деякі деацетилази, наприклад, HDA2 з *Trichoderma atroviride*, беруть участь у взаємодії з рослинами-хазяями (Lee et al., 2019). HDA7 каталітично неактивна, проте її делеція у *A. thaliana* призводить до гіперацетилювання гістонів і порушень розвитку, що вказує на її можливу структурну роль в регуляторних комплексах (Kim et al., 2024).

Окрім фундаментального значення для розуміння епігенетичної регуляції у рослин, вивчення гістондеацетилаз має значний прикладний потенціал. Гістондеацетилази беруть участь у формуванні адаптивних відповідей на стресові чинники, такі як засолення, посуха, температурні коливання та світловий режим, а також у контролі росту, диференціації та старіння рослинних тканин. Їх інгібування або цільова модифікація може слугувати інструментом для індукції морфогенезу *in vitro*, підвищення стресостійкості культур (Yu et al., 2011; Hoermayer et al., 2024) або тонкого регулювання розвитку рослин. З огляду на це, структурна характеристика гістондеацетилаз відкриває перспективи створення селективних інгібіторів та розроблення біотехнологічних стратегій для оптимізації росту й стійкості рослин за умов глобальних змін клімату.

Особливої уваги заслуговує вивчення взаємодії гістондеацетилаз з тубуліном, що може мати важливе значення для з'ясування та регулювання функцій мікротрубочок. Взаємодія з тубуліном є важливою для забезпечення стабільності мікротрубочок, що може впливати на динаміку розвитку рослини (Rayevsky et al., 2023; Rayevsky et al., 2025). Зокрема, показано, що деякі гістондеацетилази, такі як HDA14 *A. thaliana*, можуть брати участь у регулюван-

ні активності мікротрубочок через взаємодію з тубуліном (Tran et al., 2012; Rybachuk et al., 2025), що має потенціал для регуляції росту та розвитку клітин.

Тому у цій роботі проведено порівняльний аналіз структур гістондеацетилаз рослин, зокрема *A. thaliana* та *O. sativa*, з акцентом на характеристику консервативних та унікальних елементів їх третинної структури, каталітичних сайтів та потенційних поверхонь взаємодії, зокрема з тубуліном та іншими білковими субстратами деацетилювання. Також в роботі оцінено особливості взаємодії рослинних гістондеацетилаз з відомими інгібіторами, такими як трихостатин А, САНА (субероіланлід гідроксамова кислота), бутират натрію, АРО (2-аміно-3Н-феноксазин-3-он) та АМРО (2-аміно-7-метокси-3Н-феноксазин-3-он) (Lochmanová et al., 2019; Martínez et al., 2021; Tanaka et al., 2015; Venturelli et al., 2015; Xu et al., 2022). Таким чином, вдалось виділити ключові структурні детермінанти каталітичної активності рослинних гістондеацетилаз. Передбачається, що визначення структурних осоловостей буде корисним для розробки селективних інгібіторів, а також більш глибокого розуміння функціональної ролі гістондеацетилаз та їх взаємодії з білковими субстратами деацетилювання, такими як тубулін.

Матеріали та методи. Наявність секвенованих амінокислотних послідовностей гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa* було встановлено шляхом аналізу доступної інформації у відкритій базі даних UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Їх повноту чи частковість у відповідності до даних щодо каталітичного гістондеацетилазного домену було проаналізовано за допомогою інструменту прогнозування доменної архітектури білків SMART (<https://smart.embl.de/>). На основі отриманих даних щодо амінокислотних послідовностей проаналізовано наявність експериментально визначених кристалічних структур цих білків в базі даних RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Оскільки переважна більшість розглянутих гістондеацетилаз не мала експериментально визначених просторових структур, було розглянуто білкові моделі, прогнозовані за допомогою AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). З метою оцінки якості цих моделей

було використано веб-сервіс MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

Оскільки ключова мета роботи передбачала визначення подібностей та відмінностей в структурі каталітичних доменів різних рослинних гістондеацетилаз, було проведено множинне структурне вирівнювання та ліганд-білковий докінг. Множинне структурне вирівнювання білкових моделей проводили за допомогою програмного пакету PyMOL (<https://www.pymol.org/>). Для докінгу використовували як PDB-структури для експериментально встановлених, так і моделі AlphaFold для решти гістондеацетилаз. Відсутні амінокислотні залишки в експериментально встановлених просторових структурах добували за допомогою SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Іон цинку додавали до каталітичного сайту AlphaFold моделей по аналогії з експериментально встановленою структурою деацетилази HDA15 *A. thaliana* (PDB ID: 6J6T) та з урахуванням каталітичного мотиву 'XDXH', важливого для зв'язування Zn²⁺ у всіх класичних гістондеацетилаз (Saharan et al., 2024). Молекулярний докінг здійснювали за допомогою AutoDock Vina 1.2.5 (<https://github.com/ccsb-scripps/AutoDock-Vina/releases>). Структури білків було під-

готовлено за допомогою пакета ADFR Suite (<https://ccsb.scripps.edu/adfr/>), що включало оптимізацію геометрії, мінімізацію енергії та створення PDBQT-файлів рецептора. Хімічні структури інгібіторів рослинних гістондеацетилаз були отримані з бази даних PubChem. Підготовку лігандів здійснювали з використанням Python-пакета Meeko (<https://pypi.org/project/meeko/>), який конвертує структурні файли у формат PDBQT, додає атоми водню, визначає ротаційні зв'язки та часткові заряди, забезпечуючи сумісність з AutoDock. Докінг проводили з центруванням сітки (grid box) на каталітичному сайті кожного білка, використовуючи стандартну функцію оцінки AutoDock Vina для розрахунку енергії зв'язування та визначення найбільш імовірних конформацій комплексу білок-ліганд (Holcomb et al., 2022).

Результати та обговорення. На початку досліджень нами було узагальнено інформацію про секвеновані на сьогоднішній день амінокислотні послідовності *A. thaliana* (HDA2, HDA5-10, HDA14-15, HDA17-19) та 4 *O. sativa* (HDAC1-3, HDAC10) (табл. 1). Результати аналізу доменної архітектури цих білків свідчать про відсутність анованої послідовності каталітичних доменів для HDA10 та HDA17 *A. thaliana*. Реш-

Таблиця 1. Секвеновані амінокислотні послідовності рослинних гістондеацетилаз та інформація про їх просторову структуру

Організм	Білок	Амінокислотна послідовність (UniProt ID)	Просторова структура (PDB ID)
<i>A. thaliana</i>	HDA2	Q944K3	8WZL
<i>A. thaliana</i>	HDA5	Q8RX28	
<i>A. thaliana</i>	HDA6	Q9FML2	
<i>A. thaliana</i>	HDA7	Q9FH09	
<i>A. thaliana</i>	HDA8	Q94EJ2	
<i>A. thaliana</i>	HDA9	Q8H0W2	6J6T
<i>A. thaliana</i>	HDA10	Q9M1N8	
<i>A. thaliana</i>	HDA14	Q941D6	
<i>A. thaliana</i>	HDA15	Q8GXJ1	
<i>A. thaliana</i>	HDA17	Q9LXN8	
<i>A. thaliana</i>	HDA18	Q8LRK8	
<i>A. thaliana</i>	HDA19	O22446	
<i>O. sativa</i>	HDAC1	Q7Y0Y8	
<i>O. sativa</i>	HDAC2	Q6YV04	
<i>O. sativa</i>	HDAC3	Q7Y0Y6	
<i>O. sativa</i>	HDAC10	Q2QWU2	

та гістондеацетилаз мають лише каталітичні гістондеацетилазні домени, окрім HDA15, яка містить в своєму складі одночасно з чотирма деацетилазними доменами також домен цинкового пальця (Chen et al., 2020). Подібну структуру має HDAC6 людини (*Homo sapiens*), котра окрім двох тандемних каталітичних деацетилазних доменів має також у своєму складі убіквітинзв'язуючий домен (цинкового пальця) (Bahram Sangani et al., 2024). Відомо, що N-кінцевий домен цинкового пальця у HDA15 посилює димеризацію деацетилазного домену та підвищує його ферментативну активність (Chen et al., 2020). По аналогії з HDAC6 людини можна припустити, що домен цинкового пальця у деацетилази HDA15 із *A. thaliana* також може бути залученим до процесів убіквітинування та брати участь в аутофагії, оскільки відомо, що HDAC6 *H. sapiens* бере участь у деградації неправильно згорнутих та агрегованих білків (Bahram Sangani et al., 2024).

На сьогоднішній день немає жодного експериментального доказу того, що HDA15 *A. thaliana* безпосередньо деацетилює тубулін, наприклад, як це доведено для HDA14 *A. thaliana* (Tran et al., 2012). Проте слід звернути увагу на можливий зв'язок HDA15 *A. thaliana* з тубуліном та більш детально вивчити це питання, оскільки встановлено, що завдяки взаємодії з мікротрубочками HDAC6 людини сприяє аутофагічній деградації та кліренсу кількох білкових агрегатів, включаючи HTT, LC3, ATXN3, CFTR, KALRN (калірин7), SNCAIP, MAPT, маркер агресомі VIM, білки E3-лігази STUB1 (CHIP) та TRIM50 (Bahram Sangani et al., 2024; Rayevsky et al., 2025), тобто взаємодія з тубуліном є тісно пов'язаною з функцією аутофагії і, відповідно, наявним доменом цинкового пальця. Більше того, досі не приведено експериментальних доказів взаємодії HDA15 *A. thaliana* з тубуліном. Так само, поки що немає ніякої інформації про наявність у решти розглянутих рослинних гістондеацетилаз доменів, не пов'язаних з деацетилазною активністю.

Варто зазначити, що лише для деацетилаз HDA7 (PDB ID: 8WZL) та HDA15 (PDB ID: 6J6T) *A. thaliana* є експериментально встановлені за допомогою рентгеноструктурного аналізу просторові структури, в той час як просторова структура решти розглянутих нами гіс-

тондеацетилаз лишається не встановленою. Структура HDA7 має роздільну здатність 1,50 Å, що відповідає гарній якості. Довжина послідовності HDA7 складає 409 амінокислотних залишків. Структура 8WZL не є повноатомною і включає амінокислотні залишки 8–383. Оскільки деацетилазний домен відповідає 11–324 амінокислому залишку, як було визначено нами за допомогою SMART, то наявна експериментально встановлена просторова структура повністю його відтворює. Таким чином, вона є достатньо придатною для використання в дослідженнях *in silico*. Структура HDA15 має роздільну здатність 2,36 Å, що також, враховуючи розмір, відповідає гарній якості. Дана експериментально встановлена структура включає чотири каталітичних домени (ланцюг А: відтворено 148–505, відсутні 464–468 амінокислотні залишки, ланцюг В: відтворено 146–509, відсутні 464–471 амінокислотні залишки, ланцюг С: відтворено 150–505, відсутні 464–475 амінокислотні залишки, ланцюг D: відтворено 147–507, відсутні 464–473 амінокислотні залишки). Довжина послідовності HDA15 складає 552 амінокислотних залишки (86–115 відповідають домену цинкового пальця, 149–462 – деацетилазному домену). Таким чином, наявна експериментально встановлена просторова структура HDA15 (PDB ID: 6J6T) являє собою тетрамер, кожен ланцюг якого відповідає довжині деацетилазного домену, проте не включає їх у повному амінокислотному складі. Відсутні амінокислотні залишки імовірно відповідають невпорядкованим регіонам. Дана структура також може бути використана в подальших дослідженнях *in silico*, однак потребуючи для отримання більш достовірних результатів прогнозування положення відсутніх амінокислотних залишків за допомогою програм з моделювання просторової структури білків.

Оскільки лише дві з розглянутих нами гістондеацетилаз мають експериментально встановлені просторові структури, було проведено оцінку якості прогнозованих моделей AlphaFold. Оцінка якості враховувала положення атомів, зв'язки та кути між ними, стеричні зіткнення, ротамери, включаючи такі показники, як: Clashscore (all atoms), Poor rotamers, Favored rotamers, Ramachandran outliers, Ramachandran favored, Ramachandran Z-score, MolProbi-

ty score, C β deviations >0,25 Å, Bad bonds, Bad angles, Cis Prolines, Cis nonProlines, Twisted Peptides, CaBLAM outliers, CA Geometry outliers (Williams et al., 2018). Основними сумарними показниками є: Clashscore (перекриття стеричного зіткнення всіх атомів $\geq 0,4$ Е на тисячу атомів) та MolProbity score (об'єднує оцінки зіткнення, ротамера та Рамачандрана). На основі отриманих даних можна зробити висновки, що прогнозовані AlphaFold моделі розглянутих гістондеацетилаз мають показники Clashscore та MolProbity score в межах рекомендованих значень, а отже дані моделі просторових структур відповідають гарній якості (табл. 2). Також варто додати, що для подальшої роботи нами не були взяті деацетилази HDA10 та HDA17 із *A. thaliana*, оскільки, як зазначалося вище, відомі послідовності даних білків не містять послідовностей каталітичних деацетилазних доменів.

Для розуміння особливостей взаємодії в каталітичних сайтах рослинних гістондеацетилаз та для встановлення амінокислотних залишків, що мають ключове значення для взаємодії з інгібіторами, а також потенційно білковими субстратами деацетилювання, було виконано ліганд-білкові докінги інгібіторів в сайти зв'язування каталітичних доменів гістондеаце-

тилаз та структурні вирівнювання AlphaFold моделей просторових структур рослинних гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa*. Відомо, що цинк є важливим для деацетилювання субстратів. Так, каталітична активність гістондеацетилаз базується на наявності іона Zn^{2+} у їхньому активному сайті, який координується кількома амінокислотними залишками (в першу чергу діадою аспартат-гістидин, а також двох аспартатів, двох гістидинів та тирозину (Yoshida et al., 2017; Yusuf et al., 2021; Delcuve et al., 2012)) і забезпечує поляризацію молекули води, що виступає нуклеофілом у реакції деацетилювання (Vannini et al., 2004; Porter and Christianson, 2019). Іон цинку стабілізує перехідний стан та сприяє гідролітичному відщепленню ацетильної групи з ϵ -аміногрупи лізину субстрату, що є ключовим етапом каталізу Zn -залежних гістондеацетилаз. Наявність у структурі HDACis хімічних груп, здатних зв'язувати Zn^{2+} (так званих zinc-binding groups), додатково підтверджує критичну роль цього іона у механізмі деацетилювання (Zhang et al., 2020). Таким чином, можемо констатувати, що деацетилювання білкових субстратів відбувається в кишені каталітичного сайту за участі іону цинку. Більшість відомих на сьогоднішній день інгібіторів гістондеацетилаз взаємодіють саме в цій кишені каталі-

Таблиця 2. Оціночні значення аналізу якості AlphaFold моделей просторових структур рослинних гістондеацетилаз

Організм	Білок	Clashscore, all atoms (рекомендоване значення: ≤ 20)	MolProbity score (рекомендоване значення: $\leq 2,0$)
<i>A. thaliana</i>	HDA2	0,32	0,32
<i>A. thaliana</i>	HDA5	1,08	1,08
<i>A. thaliana</i>	HDA6	0,97	0,97
<i>A. thaliana</i>	HDA7	0,94	0,94
<i>A. thaliana</i>	HDA8	1,05	1,05
<i>A. thaliana</i>	HDA9	1,19	1,19
<i>A. thaliana</i>	HDA10	0,45	0,45
<i>A. thaliana</i>	HDA14	2,19	2,19
<i>A. thaliana</i>	HDA15	1,68	1,68
<i>A. thaliana</i>	HDA17	1,2	1,2
<i>A. thaliana</i>	HDA18	1,3	1,3
<i>A. thaliana</i>	HDA19	1,43	1,43
<i>O. sativa</i>	HDAC1	1,27	1,27
<i>O. sativa</i>	HDAC2	1,66	1,66
<i>O. sativa</i>	HDAC3	1,41	1,41
<i>O. sativa</i>	HDAC10	2,09	2,09

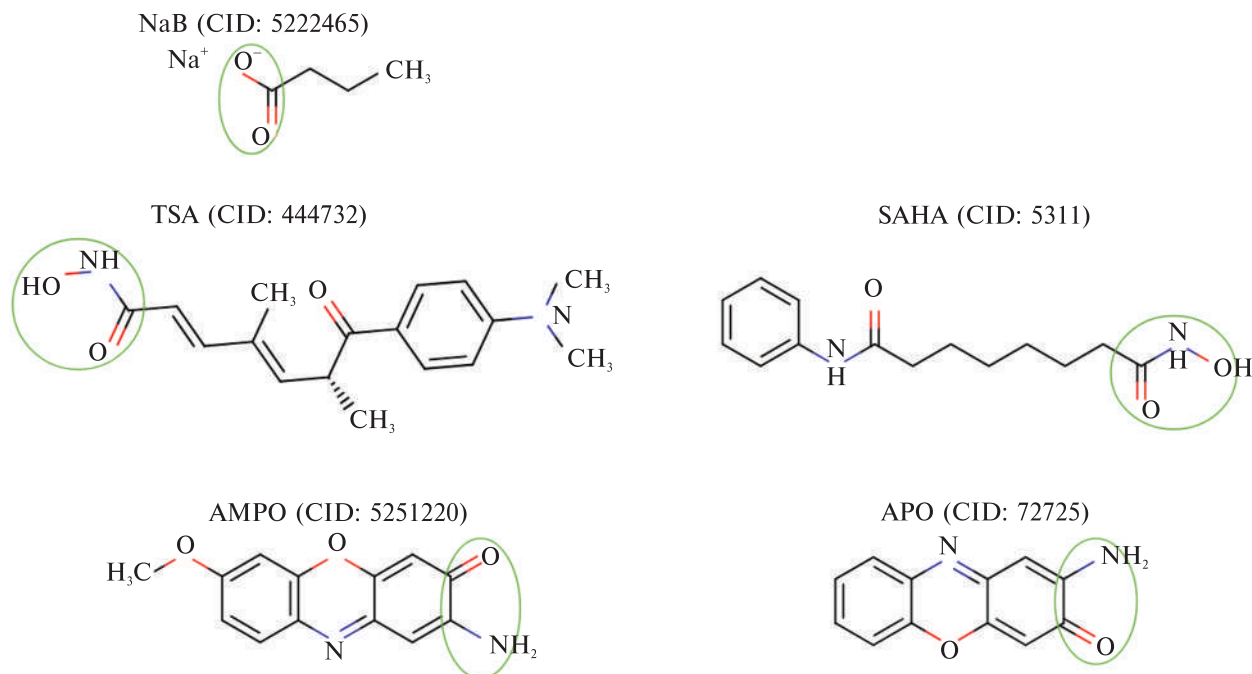


Рис. 1. Структури інгібіторів рослинних гістондеацетилаз, використаних для докінгу: NaB – бутират натрію, TSA – трихостатин А, SAHA – субероіланлід гідроксамова кислота, AMPO – 2-аміно-7-метокси-3Н-феноксазин-3-он, APO – 2-аміно-3Н-феноксазин-3-он. Зеленим кольором виділено групи, що можуть утворювати координаційні зв'язки з іоном цинку

тичного сайту (Chan et al., 2024). Проте на сьогодні є дуже обмаль даних щодо взаємодії інгібіторів з рослинними гістондеацетилазами, які мають свої еволюційні особливості, не зважаючи на значну консервативність каталітичних доменів гістондеацетилаз різного еволюційного походження, як було показано в нашій попередній роботі (Stykhylias et al., 2024). Для докінгу було обрано такі інгібітори рослинних гістондеацетилаз, як трихостатин А (Venturelli et al., 2015; Tanaka et al., 2015; Pan et al., 2025; Xu et al., 2022; Martínez et al., 2021; Lochmanová et al., 2019), SAHA (субероіланлід гідроксамова кислота) (Venturelli et al., 2015; Xu et al., 2022), бутират натрію (Xu et al., 2022; Martínez et al., 2021; Lochmanová et al., 2019), APO (2-аміно-3Н-феноксазин-3-он) та AMPO (2-аміно-7-метокси-3Н-феноксазин-3-он) (Venturelli et al., 2015) (рис. 1).

Бутират натрію – похідна масляної кислоти, є одним з найбільш широко використовуваних інгібіторів саме рослинних гістондеацетилаз. Показано, що він може впливати на абіотичні та

біотичні стреси, наприклад, підвищувати стресостійкість *O. sativa* до пірікуляріозу, викликаного патогенним грибом *Magnaporthe oryzae*, шляхом активації генів, пов'язаних із захистом, зі збільшенням рівня гістону H3K9ac, а також може сприяти деградації мРНК HDAC1 (Xu et al., 2022). Також зазначається, що бутират натрію дозозалежно пригнічує ріст коренів *O. sativa*, при цьому більшою мірою у нетрансгенних проростків порівняно з трансгенними проростками з надмірною експресією HDAC1 (Chung et al., 2009). Бутират натрію, як і трихостатин А, може індукувати ембріогенез у *Vitis vinifera* (Martínez et al., 2021), а також не лише знижувати рівень ацетилювання гістонів, а і впливати на фенотипові зміни (Lochmanová et al., 2019).

Трихостатин А та SAHA відносяться до гідроксатових кислот і є одними з найвідоміших інгібіторів гістондеацетилаз як рослинних, так і тваринних організмів. За даними DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) SAHA є схваленим FDA препаратом, що використовується для лі-

кування типу раку, який починається з імунних клітин і вражає шкіру, а трихостатин А є дослідницьким препаратом, який знаходиться на другій фазі клінічних досліджень. Існує ряд робіт, в яких продемонстровано інгібування трихостатином А рослинних гістондеацетилаз. Трихостатин А, як і бутират натрію, впливає на проростання пилку, ріст поляризованих пилкових трубок у *Picea wilsonii* (Cui et al., 2015) та ефективність регенерації зародків пшениці (Bie et al., 2020). Також показано, що трихостатин А впливає на утворення калюсу рису (Zhang et al., 2020). Трихостатин А впливає на HDA19 у *A. thaliana*, що сприяло пригніченню росту рослин (Tanaka et al., 2008). Інгібування гістондеацетилаз *A. thaliana* трихостатином А стимулює органогенез пагонів у пошкоджених коренях *A. thaliana* (Pan et al., 2025), а також впливало на генну регуляцію і розвиток проростків *A. thaliana* (Tian et al., 2001). Показано, що інгібування гістондеацетилаз за допомогою SAHA підвищує солестійкість у бавовни (He et al., 2020). Також продемонстровано, що хоч цей інгібітор і не впливав значно на захист рослин від біотичного чинника *M. oryzae*, на відміну від бутирату натрію, проте значно підвищував рівень гістона H4K5ac (Xu et al., 2022).

АРО та АМРО є похідними циклічних гідроксамових кислот 2,4-дигідро-1,4-бензоксазин-3-ону (DIBOA) та її С-7-метокси похідної (DIMBOA), що містяться в ексудатах коренів. Було показано, що вони мають інгібуючу дію на гістондеацетилази *A. thaliana*, таким чином служуючи для пригнічення росту рослин-конкурентів. При цьому зазначалося, що АРО мав більш потужну інгібуючу дію (Venturelli et al., 2015).

Показово, що в ряді робіт є дані, що вказують на вищу селективність дії інгібіторів на рослинні гістондеацетилази порівняно з гістондеацетилазами людини. Так, наприклад, повідомляється, що трихостатин А та бутират натрію характеризуються різним впливом на соматичний ембріогенез, а саме, обробка бутиратом натрію призводить до підвищення ембріогенної здатності експлантів винограду, тоді як обробка трихостатином А характеризується гіршими показниками індукції у порівнянні із середовищем без інгібітору (Martínez et al., 2021). Показано, що обробка трихостатином А, SAHA та бутиратом натрію індукуює підвище-

ний рівень ацетилювання різних ділянок гістонів листової тканини *O. sativa* (Xu et al., 2022). Також зазначається, що хоча обробка АРО, АМРО, трихостатином А та SAHA призводить до підвищення рівнів гіперацетилюваного H3, проте лише обробка АРО та АМРО спричиняє підвищення рівнів ацетилювання Lys27 гістона H3 (Venturelli et al., 2015). В той час, як відомо, більшість інгібіторів гістондеацетилаз є рап-HDACis, тобто такими, що діють на всі гістондеацетилази (Curcio et al., 2024). Ці дані дають змогу припустити, що селективність інгібування HDACis у рослин може відрізнятися від такої у тварин.

Окрім того є дані, що вказують на те, що інгібуючий вплив трихостатину А на гістондеацетилази у різних видів рослин може відрізнятися. Так, наприклад, трихостатин А підвищує рівні гістона H3K9ac у кукурудзи та *A. thaliana*, тоді як у *O. sativa* цей вплив не суттєвий (Xu et al., 2022).

Також варто зазначити щодо хімічних характеристик обраних нами інгібіторів. Як показано на рис. 1, всі сполуки мають у своєму складі хелаторні групи (виділено зеленим кольором). Трихостатин А та SAHA здатні дуже добре координувати іони на кшталт Zn^{2+} , утворюючи 5-центровий хелат. АРО та АМРО є дещо слабшими хелаторами, які здатні утворювати 4-центрові хелатні комплекси, а бутират натрію є взагалі дуже слабким хелатором. Більше того, бутират натрію не може бути специфічним інгібітором і здатен утворювати лише нестабільні зв'язки у сайтах зв'язування з білковими мішенями. Неспецифічність його дії узгоджується з опублікованими даними, де зазначається, що вплив бутирату натрію на процеси раннього розвитку рослин може бути пов'язаним з його впливом на інші білкові мішені, окрім гістондеацетилаз (Lochmanová et al., 2019). Ефективність бутирату натрію щодо інгібування гістондеацетилаз імовірно може бути обумовлена його впливом на конформаційні зміни гістондеацетилаз. На основі отриманих кристалографічних даних було показано механізм дії інгібіторів трихостатину А та SAHA. Зазначається, що вони знаходяться в трубчастій кишені сайту зв'язування та можуть утворювати координаційні зв'язки з іоном цинку за участі групи гідроксамової кислоти, зануреної

у глибину кишені разом з більшою частиною аліфатичного ланцюга (Finnin et al., 1999). Деталі інгібуючої дії бутирату натрію на сьогоднішній день залишаються найменш вивченими. Існує припущення, що дві молекули бутирату натрію можуть займати гідрофобну щілину подібно до трихостатину А. Також зазначається, що бутират натрію є неконкурентним HDACi, тому може не взаємодіяти з активним сайтом деацетилази (Lochmanová et al., 2019). З огляду на зазначену неспецифічність та нестабільність зв'язування бутирату натрію з білковими мішенями можна припустити, що він дійсно не може бути конкурентним, оскільки зв'язування не є стійким і він не зможе конкурувати з субстратом чи тими хелаторами, які вже є в металопротеїні. В той же час не виключено,

що бутират натрію може взаємодіяти з сайтом зв'язування, але цей зв'язок не буде стабільним.

Щоби більш детально зрозуміти механізми дії HDACis на рослинні гістондеацетилази, нами було перевірено висловлені вище припущення. З цією метою обрані інгібітори було доковано в каталітичні сайти гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa*. В табл. 3 наведено значення спорідненості зв'язування, отримані в результаті ліганд-білкового докінгу.

Отримані нами дані лише частково узгоджуються з припущенням щодо більшої селективності дії інгібіторів на рослинні гістондеацетилази, порівняно з тваринними. Як видно з табл. 3 SAHA дійсно демонструє певну селективність дії на розглянуті рослинні гістондеацетилази, порівняно, наприклад, з людсь-

Таблиця 3. Показники спорідненості зв'язування інгібіторів з рослинними гістондеацетилазами

Білкова мішень	Спорідненість (ккал/моль)				
	Трихостатин А	SAHA	Бутират натрію	АРО	АМРО
HDA2	-7,3	-7,7	-5,3	-6,7	-7,9
<i>A. thaliana</i>					
HDA5	-7,7	-5,6	-4,5	-5,5	-5,7
<i>A. thaliana</i>					
HDA6	-7,5	-3,6	-5,2	-5,7	-5,2
<i>A. thaliana</i>					
HDA7	-4,7	-1,6	-4,3	-7,2	-4,8
<i>A. thaliana</i>					
HDA8	-7,8	-4,8	-4,8	-5,7	-6,3
<i>A. thaliana</i>					
HDA9	-6,0	-3,8	-4,4	-5,4	-5,5
<i>A. thaliana</i>					
HDA14	-7,8	-5,2	-4,9	-4,6	-4,9
<i>A. thaliana</i>					
HDA15	-9,3	-5,6	-4,6	-5,7	-6,0
<i>A. thaliana</i>					
HDA18	-8,3	-5,3	-4,3	-5,8	-5,7
<i>A. thaliana</i>					
HDA19	-7,3	-4,1	-4,7	-5,7	-5,2
<i>A. thaliana</i>					
HDAC1	-7,0	-4,1	-4,7	-5,8	-5,1
<i>O. sativa</i>					
HDAC2	-7,4	-4,0	-4,7	-6,3	-6,0
<i>O. sativa</i>					
HDAC3	-8,0	-5,1	-4,7	-6,1	-6,0
<i>O. sativa</i>					
HDAC10	-7,8	-5,4	-4,7	-6,5	-6,4
<i>O. sativa</i>					

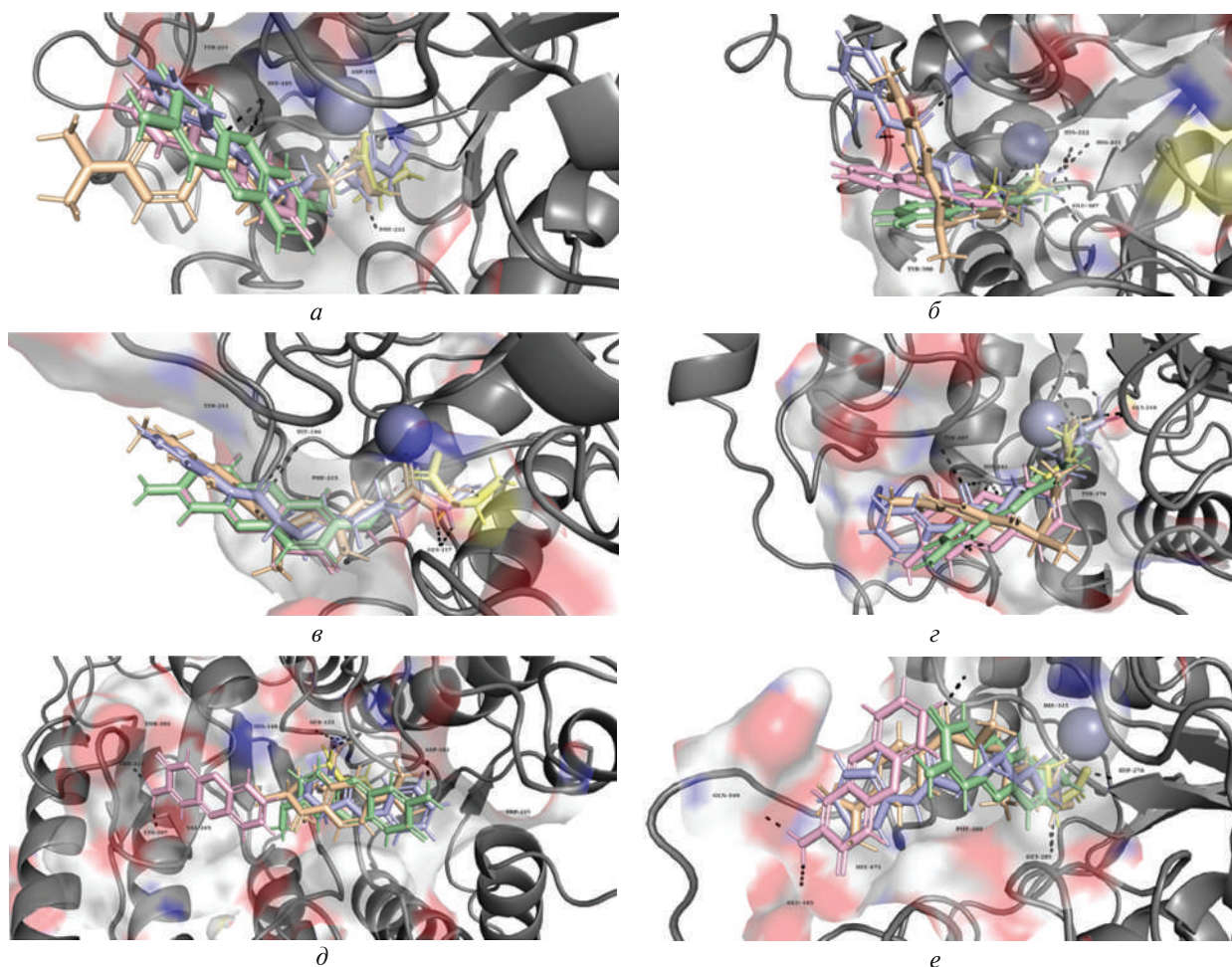


Рис. 2. Просторові структури сайтів зв'язування гістондеацетилаз (а – HDAC3 *O. sativa*, б – HDAC10 *O. sativa*, в – HDA19 *A. thaliana*, г – HDA14 *A. thaliana*, д – HDA7 *A. thaliana*, е – HDA15 *A. thaliana*) з інгібіторами (трихостатин А – коричневий, SAHA – блакитний, бутират натрію – жовтий, АРО – рожевий, АМРО – зелений)

кими, де цей інгібітор проявляє інгібуючу дію щодо всіх типів (Hsu CW et al., 2016). За отриманими нами даними SAHA є неактивним до HDA7, HDA6 та HDA9 *A. thaliana*, а також має дуже низьку інгібуючу активність на HDA19 *A. thaliana* та HDAC1 і HDAC2 *O. sativa*. При цьому найвищі показники афінності SAHA проявляє до деацетилази HDA2 *A. thaliana*. Трихостатин А також є pan-HDACi і здатен інгібувати всі типи гістондеацетилаз людини (Hsu CW et al., 2016). Проте отримані нами дані не узгоджуються з припущенням щодо більшої селективності дії на рослинні гістондеацетилази, оскільки було встановлено дос-

татньо високі показники спорідненості трихостатину А щодо всіх розглянутих нами гістондеацетилаз (табл. 3). Решта розглянутих нами інгібіторів також не виявили значної селективності щодо різних типів гістондеацетилаз. Показово, що бутират натрію має майже однакові невисокі показники спорідненості зі всіма розглянутими гістондеацетилазами, що коливаються в межах -4.3 — -5.3 ккал/моль (табл. 3). Це узгоджується з вище наведеним припущенням щодо неспецифічності, нестабільності та неселективності зв'язування бутирату натрію. При цьому, виходячи з отриманих нами даних, можна говорити про можливість зв'язування

AF-022446-hda19_at	DIAINWAGGL-----HHAK--KCEAS-GFCYVN	GLY157
AF-Q2QWU2-hdac10_os	-----ASKLG-----FKPPLGFALVRPPG--HHAV--FESEPM-GFCVFG	HIS221, HIS222
AF-Q6YV04-hdac2_os	-----LNK-----GTHDIAINWS-----GGLHNAK--KCEAS-GFCYVN	GLY166
AF-Q7Y0Y6-hdac3_os	-----LNK-----GTHDIAINWS-----GGLHNAK--KCEAS-GFCYVN	GLY166
AF-Q7Y0Y8-hdac1_os	-----MAK--KCEAS-GFCYVN	GLY161, PHE162
AF-Q8GXJ1-hda15_at	-----GFALVRPPG--HHAG--VRHAM-GFCFLN	HIS276, GLY285, PHE286
AF-Q8H0W2-hda9_at	-----HHAKKC--DAS-GFCYIN	HIS137, GLY145
AF-Q8LRK8-hda18_at	-----CGFAIVRPPG--HHAE--SDEAM-GFCFLN	GLY199
AF-Q8RX28-hda5_at	-----CGFAIVRPPG--HHAE--ADEAM-GFCFLN	GLY166
AF-Q9FH09-hda7_at	DIAINWAGS-----MHHV--KKDKASGFCYVN	HIS148, SER155
AF-Q9FML2-hda6_at	-----HHAK--KCEAS-GFCYVN	
AF-Q94EJ2-hda8_at	-----IAYALVRPPG--HHQ--PTQAD-GVCFIN	HIS144, GLY153
AF-Q94ID6-hda14_at	-----ASR-----NSVDPPFGFALIRPPG--HHAV--FKSEPM-GFCVFG	GLY210
AF-Q944K3-hda2_at	-----TERGWAINIG-----GGF-HHCT--AERGG-GFCAPA	HIS200, GLY209
AF-022446-hda19_at	DIIVLAILELL-----KQH-----ERVLYVDIDIHNGDGVEEAFYATDRVMTVSF	HIS186
AF-Q2QWU2-hdac10_os	NIAVAARYAQ-----N--QHGLKRVMIIDFVHHGNGSTODATYEDPDIFFLST	
AF-Q6YV04-hdac2_os	DIIVLAILELL-----K--LH--ERVLYVDIDIHNGDGVEEAFYITNRVMTVSF	HIS195
AF-Q7Y0Y6-hdac3_os	DIIVLAILELL-----K--LH--ERVLYVDIDIHNGDGVEEAFYITNRVMTVSF	ASP193, HIS195
AF-Q7Y0Y8-hdac1_os	DIIVLAILELLKYM-----QVLYVDIDIHNGDGVEEAFYITDRVMTVSF	HIS190
AF-Q8GXJ1-hda15_at	NAAVAALVAQ-----AA--GAKVLYVMDVHHGNGTQEIFEQNKSVLYISL	HIS315
AF-Q8H0W2-hda9_at	DIIVLAILELLKHH-----PVLYVDIDVHHGNGVEEAFYITDRVMTVSF	HIS174
AF-Q8LRK8-hda18_at	NVAVAASFLNERPDLD-----VKILIVDWDIHNGNGTQKGFWDKSRVLIFS	HIS233
AF-Q8RX28-hda5_at	NVAVAASFLNERPDLG-----VKILIVDWDVHHGNGTQKGFWDKPRVLFFSV	HIS200
AF-Q9FH09-hda7_at	DIIVLAILELL-----K--LH--ERVLYVDIDIHNGDGVEEAFYITDRVMTVSF	
AF-Q9FML2-hda6_at	DIIVLAILELL-----K--LH--ERVLYVDIDIHNGDGVEEAFYITDRVMTVSF	HIS190
AF-Q94EJ2-hda8_at	NAALAVKLAL-----NSGS--CSRVAVIDIDVHHGNGTAEQFYTSRVLTVSL	
AF-Q94ID6-hda14_at	NVAIAARHAQ-----R--THGLKRIPIIDFVHHGNGSTDAFTEDPDIFFLST	HIS241
AF-Q944K3-hda2_at	DISLCIHFAF-----L--RLRISRVMIIDLDARQQNGHETDLDGDNRVILDM	HIS240
AF-022446-hda19_at	HK-----F-----GD--YFP--G--TG--HIQDIG-----	TYR212, PHE213
AF-Q2QWU2-hdac10_os	HQ-----L-----G--SY-P--G--TG--KIMGVG-----	
AF-Q6YV04-hdac2_os	HK-----F-----G--DYFP--G--TG--DIRDIG-----	TYR221, PHE222
AF-Q7Y0Y6-hdac3_os	HK-----F-----G--DYFP--G--TG--DIRDIG-----	TYR221, PHE222
AF-Q7Y0Y8-hdac1_os	HK-----F-----G--DYFP--G--TG--DIRDIG-----	PHE217
AF-Q8GXJ1-hda15_at	HRHEGGNF-----Y-P--G--TG--AADEVG-----	
AF-Q8H0W2-hda9_at	HKFSDKE-----E-P--G--TG--DVKEIG-----	PHE201, PHE202
AF-Q8LRK8-hda18_at	HRHDMGT-----Y-PFGDD--G--DFNVG-----	TYR262
AF-Q8RX28-hda5_at	HRHEYGG-----Y-P--AGDD--G--DYNMG-----	PHE228
AF-Q9FH09-hda7_at	HK-----V-----GD--SY-P--G--TG--DISDYG-----	LYS207, THR211
AF-Q9FML2-hda6_at	HK-----F-----GD--FFP--G--TG--HIRDVG-----	PHE216, PHE217
AF-Q94EJ2-hda8_at	HM-----NHGSHWSSHPQ-----FG--SIDELG-----	TRP211
AF-Q94ID6-hda14_at	YN-----D-----G--SY-P--G--TG--KISDIG-----	TYR267
AF-Q944K3-hda2_at	YH-----P-----E--TY-P--F--DYPAR--RFDQKVENVMSGT	TYR266
AF-022446-hda19_at	CGADSL-SGDRL--GCFNLSINGHAECVKFMRSFNVFLLLLGG-----	
AF-Q2QWU2-hdac10_os	AGYDAM-ALDPL--A-----GLQFT-TGT--F	
AF-Q6YV04-hdac2_os	CGAD-----	
AF-Q7Y0Y6-hdac3_os	CGAD-----	
AF-Q7Y0Y8-hdac1_os	CGADSL-SGDRL--G-----CFNLS-IRG--H	LEU283
AF-Q8GXJ1-hda15_at	AGFDAAR-GDPLGCG-----DVTFP-AG--Y	
AF-Q8H0W2-hda9_at	CGADSL-ARDRLG-----CFNLS-IDGHA-	
AF-Q8LRK8-hda18_at	AGFDAAT-GDPL--G-----GCCVT-PYG--Y	LEU331
AF-Q8RX28-hda5_at	AGFDAAT-INDPL--G-----GCCVT-PYG--Y	
AF-Q9FH09-hda7_at	CGADSL-AGDPL--G-----TFNLS-IRG--H	
AF-Q9FML2-hda6_at	CGADSL-SGDRL--G-----CFNLS-VRG--H	LEU283
AF-Q94EJ2-hda8_at	VQGDSS-AFDPLG-----RQSLT-MNG--Y	
AF-Q94ID6-hda14_at	AGYDAM-VLDPL--A-----NLQFT-TAT--Y	
AF-Q944K3-hda2_at	AGTDIL-DGDPL--G-----LLRIS-PDG--I	
AF-022446-hda19_at	-GGYTI-----	
AF-Q2QWU2-hdac10_os	EGGYNL-----	GLU387, TYR390
AF-Q6YV04-hdac2_os	-GGYTI-----	
AF-Q7Y0Y6-hdac3_os	-GGYTI-----	
AF-Q7Y0Y8-hdac1_os	-GGYTI-----	
AF-Q8GXJ1-hda15_at	EGGYNL-----	
AF-Q8H0W2-hda9_at	-GGYTI-----	
AF-Q8LRK8-hda18_at	EGGYNL-----	TYR364
AF-Q8RX28-hda5_at	EGGYNL-----	TYR331
AF-Q9FH09-hda7_at	-GGYTI-----	
AF-Q9FML2-hda6_at	-GGYTI-----	
AF-Q94EJ2-hda8_at	EGGYHYTAAVCLHAMLEGVLEKIPFPHLSDFIAYYPFEERANAVAVESIRYVHTF	TRY318
AF-Q94ID6-hda14_at	EGGYNL-----	TYR370
AF-Q944K3-hda2_at	GGYI-M-----	

Рис. 3. Множинне структурне вирівнювання рослинних гістондеацетилаз. Сірим кольором виділено амінокислотні залишки, які утворювали стійкі водневі зв'язки та pi-stacking взаємодії у комплексах з розглянутими інгібіторами

бутирату натрію у каталітичній кишені сайту зв'язування. З огляду на всі ці обставини можливо припустити, що найімовірнішим механізмом дії бутирату натрію на гістондеацетилази є його вплив на конформаційні зміни, що унеможлиблює в подальшому взаємодію певних гістондеацетилаз з їх білковими субстратами.

Оцінюючи результати докінгу ми також звертали увагу на взаємодію інгібіторів з іоном цинку в глибині каталітичної кишені сайту зв'язування. Як зазначалося вище, всі обрані нами інгібітори мають більші чи менші хелатні властивості. Показово, що бутират натрію все ж взаємодіє з іоном цинку (рис. 2). Проте слід враховувати, що ці зв'язки не здатні бути ані стійкими, ані конкурентноспроможними. Найвигідніші положення трихостатину А та SAHA в комплексах з усіма розглянутими гістондеацетилазами також свідчать про взаємодію цих сполук з іоном цинку. Оскільки обидва інгібітори є сильними хелаторами, здатними утворювати 5-центрові хелатні комплекси, то можна припустити, що дані зв'язки у поєднанні зі значеннями високої спорідненості будуть достатньо стійкими.

Щодо APO та AMPO, то раніше зазначалось, що вони утворюють зв'язки з Zn^{2+} при взаємодії з рослинними гістондеацетилазами (Venturelli et al., 2015). Проте отримані нами дані не підтверджують це твердження. Імовірніше за все це пов'язано з тим, що в цій роботі використовували бактеріальний гомолог гістондеацетилази (PDB ID: 1C3R) як шаблон для моделювання просторових структур HDA2 та HDA6 *A. thaliana*, які, як зазначається і самими авторами, мають ідентичність лише 27 та 35 % відповідно щодо референтного зразку. Нами ж було встановлено, що обидва інгібітори можуть взаємодіяти з цинком у глибині трубчастої кишені сайту зв'язування лише HDAC10 *O. sativa*. При цьому AMPO здатен зв'язувати цинк і у HDA8, і у HDA15 *A. thaliana*. На рис. 2 наведено декілька комплексів, які наглядно демонструють розташування інгібіторів у кишені сайту зв'язування. З цього бачимо, що APO та AMPO часто не занурені в кишеню до рівня Zn^{2+} , що імовірніше за все пов'язане з їх структурними особливостями. Адже трихостатин А та SAHA взаємодіють з іоном цинку групою гідроксамової кислоти

на кінці саме їх аліфатичних частин, що легко проникають до гідрофобної трубчастої кишені сайту зв'язування, в той час, як APO та AMPO є похідними циклічних гідроксамових кислот. Це може створювати стеричні перешкоди для проникнення цих інгібіторів в глибину трубчастої кишені та забезпечення стабільності такого положення. Також важливими факторами такої взаємодії є те, що дані 3-циклічні ароматичні сполуки мають жорстку конформацію та достатньо слабку хелатуючу здатність, обумовлену тим, що хелатуючі групи зв'язані з ароматичним кільцем.

В ході аналізу нами не було виявлено зв'язку між класами гістондеацетилаз та їх характерними взаємодіями з інгібіторами (рис. 2 та рис. 3), проте було встановлено певні характерні для окремих гістондеацетилаз спільні структурно подібні мотиви, важливі для зв'язування інгібіторів та білкових субстратів деацетилювання (рис. 4). Це дозволяє нам зробити припущення щодо їх функціональних особливостей, а саме деацетилювання певних субстратів на основі структурної подібності мотивів, а також можливої вищої селективності на основі відмінностей в їх структурі порівняно з рештою розглянутих гістондеацетилаз.

На рис. 3 виділено амінокислотні залишки, здатні утворювати стійкі водневі зв'язки та π -stacking взаємодії у комплексах з розглянутими інгібіторами. За типовими ознаками ключових взаємодій з інгібіторами в сайтах зв'язування гістондеацетилаз нами було встановлено чіткий зв'язок між структурними особливостями HDACs та позиціюванням лігандів. Як відомо, вплив амінокислотних замін на структуру білка визначається не їхньою кількістю, а хімічною природою та локалізацією. Навіть поодинокі «радикальні» заміни можуть спричиняти суттєві конформаційні зсуви. Наприклад, заміна гідрофобних залишків у ядрі (Leu, Ile, Phe) на полярні або заряджені (Ser, Asp, Lys) порушує упаковку ядра (Robinson et al., 2014), введення α -спіралі через обмеження ϕ -кутів (Schmidt et al., 2016), а заміни His можуть змінювати локальну електростатику та водневі зв'язки завдяки його змінній протонваності (Sun et al., 2024). Водночас численні «консервативні» заміни (Val $\leftrightarrow$ Ile, Ser $\leftrightarrow$ Thr, Asp $\leftrightarrow$ Glu), особливо на поверхні білка, часто не змінюють



глобальної конформації (Bigman et al., 2018). Таким чином, білки з мінімальними, але структурно критичними замінами можуть відрізнятися значно сильніше, ніж варіанти з більшою кількістю хімічно подібних мутацій. Саме тому нами було застосовано метод множинного структурного вирівнювання, а не вирівнювання послідовностей. Доцільність цього методу підтверджується наведеними нами даними (рис. 3–4). Це дозволило визначити та порівняти саме структурні особливості ключових мотивів важливих для зв'язування.

На основі аналізу отриманих результатів ліганд-білкового докінгу та множинного структурного вирівнювання нам вдалось встановити консервативні структурні мотиви, що формують кишеньку сайту зв'язування, і є важливими для взаємодії з інгібіторами та білковими субстратами деацетилювання рослинних гістондеацетилаз (рис. 4). З огляду на подібності та відмінності в п'яти консервативних структурних мотивах каталітичного домену встановлено, що найбільш структурно подібними є HDAC2 та HDAC3 *O. sativa*, а близькими до них, хоч і зі своїми особливостями, є HDA1 *O. sativa*, HDA6 та HDA19 *A. thaliana*. Значну структурну подібність між собою мають також HDA5 та HDA18 *A. thaliana*. Цікаво, що до деацетилази HDA14, залученої до деацетилювання тубуліну у *A. thaliana*, найбільшу структурну подібність має HDAC10 *O. sativa*, що дає можливість припустити, що вона також може бути залученою до деацетилювання тубуліну. Це узгоджується з нашими даними щодо філогенетичної спорідненості HDAC10 *O. sativa*, HDA14 *A. thaliana* та HDAC6 *H. sapiens* (Stykhylas et al., 2024).

Ще одним підтвердженням як цього припущення, так і виявленої нами в ході аналізу структурної подібності, і того що це може мати прямий зв'язок з функціональною роллю конкретних гістондеацетилаз, є дані щодо подібності функціональної ролі HDA1 *O. sativa* та HDA19 *A. thaliana*. Відомо, що обидві гістондеацетилази пригнічують гени, пов'язані з імунною відповіддю рослин, шляхом деацетилювання гістонів у промоторах цих генів, що запобігає їх надмірній експресії та регулює відповідь на патогени (Choi et al., 2012; Hou et al., 2024). Також варто зазначити, що най-

більш вигідні положення інгібіторів в сайтах зв'язування гістондеацетилаз, отримані в результаті докінгу (рис. 2), прямо корелюють з результатами структурного вирівнювання (рис. 4).

У ході аналізу взаємодії досліджуваних рослинних гістондеацетилаз з цинком було встановлено чотири амінокислотні залишки, відповідальні за зв'язування Zn^{2+} в активному центрі цих металопротеїнів (рис. 4). Є дані, які вказують на те, що HDA7 *A. thaliana* є каталітично неактивною, тобто такою, що втратила свою деацетилазну активність через нездатність зв'язувати Zn^{2+} в каталітичній кишеньці. Це пов'язано з тим, що амінокислотні залишки Asp та His мотиву 'XDXH', необхідного для координації з Zn^{2+} і характерного для решти гістондеацетилаз, мutowані до залишків Gly та Pro, утворюючи мотив 'XGXP' (Saharan et al., 2024). Отримані результати підтверджують, що саме Asp та His в основному відповідальні за зв'язування Zn^{2+} у рослинних гістондеацетилаз. При цьому амінокислотні залишки, що знаходяться поруч також можуть доєднуватись до хелатування.

За аналогією з HDAC8 *H. sapiens* (Shukla et al., 2021) нами було встановлено ще один залишок His (в діаді з ключовим залишком мотиву 'XDXH') та залишок Tyr, які також частково беруть участь у координації цинку у сайті зв'язування та є важливими для деацетилювання субстрату. Зокрема Shukla et al. зазначають, що у HDAC8 *H. sapiens* Zn^{2+} та His142 активують молекулу води для нуклеофільної атаки на карбоксильну групу ацетилюваного бічного ланцюга лізину, а проміжний продукт реакції стабілізується Tyr306, His142, His143 та Zn^{2+} , далі гідроліз завершується His143, який протонує бічний ланцюг лізину. Таким чином, зазначені амінокислотні залишки His та Tyr, окрім основного мотиву 'XDXH', можуть відігравати схожу роль в процесі деацетилювання. В цьому контексті важливо зауважити, що другий залишок His у HDA2 та HDA8 *A. thaliana* замінений на Gln та Tyr відповідно. На відміну від His, який є чудовим стабільним хелатором, фенольна група Tyr має значно слабші хелатуючі властивості, а у амідної групи Gln вони зовсім слабкі, проте можуть доєднуватись до хелатування з іншими сильнішими залишками. З цього можна зробити висновок про нижчу хелатуючу

здатність цих гістондеацетилаз порівняно з іншими, та припустити наявність у них специфічних субстратів деацетилювання. Також це частково пояснює, чому АМРО взаємодіє з цинком у HDA8 *A. thaliana*. У HDA2 *A. thaliana* цього не відбувається імовірно через ширину кішені і доступність цинку, що унеможливує проникнення більш жорстких 3-циклічних сполук.

Таким чином, в ході проведених досліджень нами було проаналізовано секвеновані на сьогоднішній день амінокислотні послідовності гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa*, їх доменну архітектуру, наявність експериментально встановлених просторових структур, оцінено якість прогнозованих моделей просторових структур (12 амінокислотних послідовностей *A. thaliana* та 4 *O. sativa*). Встановлено, що амінокислотні послідовності HDA10 та HDA17 *A. thaliana* наявні в базі даних UniProtKB значно короткі і не містять достатньо інформації, необхідної для реконструкції просторової структури каталітичного домена. Особливу структурну організацію має HDA15 *A. thaliana*, що складається з чотирьох каталітичних деацетилазних доменів та одного цинк-зв'язуючого домена. Оскільки експериментально встановлені структури відомі лише до HDA7 та HDA15 *A. thaliana*, було виконано оцінку якості прогнозованих моделей просторових структур. Встановлено, що вона відповідає діапазону рекомендованих значень.

За отриманими нами даними вища селективність дії інгібіторів на рослинні гістондеацетилази порівняно з деацетилазами людини підтверджувалась лише частково на прикладі SAHA. Решта розглянутих нами інгібіторів не виявили значної селективності щодо різних типів рослинних гістондеацетилаз. Показано, що бутират натрію сідає в сайт зв'язування рослинних гістондеацетилаз. Проте з огляду на хімічні характеристики бутирату натрію та невисокі показники спорідненості можна припустити, що таке зв'язування є нестійким та нестабільним, і вірогідніше за все інгібування гістондеацетилаз відбувається за рахунок індукції конформаційних змін в їх просторовій структурі. Також нами показано, що взаємодія з іоном цинку в активному сайті каталітичного домену деяких рослинних

гістондеацетилаз може бути ускладненою для циклічних похідних гідроксамових кислот, що мають більш жорстку конформацію та нижчу хелатуючу здатність.

В ході аналізу структурної подібності амінокислотних залишків, що формують кишеню сайту зв'язування, було визначено п'ять ключових структурно консервативних мотивів. Встановлено, що лише деацетилази HDA1, HDAC2, HDAC3 *O. sativa* та HDA6, HDA19 *A. thaliana*, а також HDA5 та HDA18 *A. thaliana*, мають значну структурну подібність в цих ділянках. Це додає аргументів припущенню щодо більшої селективності дії інгібіторів на рослинні гістондеацетилази порівняно з людськими. Також встановлено, що найбільшу структурну подібність до HDA14 *A. thaliana* має HDAC10 *O. sativa*. Останнє дозволяє припустити, що вона також може виконувати подібну функціональну роль, а саме бути залученою до деацетилювання тубуліну.

Також в ході аналізу було встановлено чотири ключові амінокислотні залишки, відповідальні за зв'язування Zn^{2+} в каталітичній кишені рослинних гістондеацетилаз. Отримані нами дані підтверджують, що 'XDXH' є ключовим мотивом, необхідним для зв'язування цинку, мутації в ньому призводять до втрати каталітичної активності. По аналогії з HDAC8 *H. sapiens* можемо припустити, що His з мотиву 'XDXH', сусідній His та Туг відіграють ключову роль в гідролітичному розщепленні ацетильної групи з ϵ -аміногрупи лізину білкового субстрату деацетилювання.

Таким чином, отримані нами дані розширюють загальне розуміння щодо структурної подібності каталітичних доменів рослинних гістондеацетилаз. Отримані результати можуть бути використаними для розробки селективних інгібіторів, аналізу та прогнозування функціональної ролі, субстратної специфічності, а також сприяти розробленню стратегій для регуляції росту і розвитку рослин та підвищення їх стійкості до стресів.

Дотримання етичних стандартів. Стаття не містить жодних досліджень, які були виконані з використанням лабораторних препаратів, клітинних ліній або інтактних організмів тварин чи людини.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

STRUCTURAL DETERMINANTS OF THE CATALYTIC ACTIVITY OF PLANT HISTONE DEACETYLASES

M.M. Stykhylias, O.V. Rayevsky, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Baidy-Vyshnevetskoho St., 2A, Kyiv, Ukraine, 04123

E-mail: *stihilia@gmail.com;

**cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

In this study, a comparative analysis of the amino acid sequences and domain organization of histone deacetylases (HDACs) from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* was performed, and the presence of experimentally determined 3D structures as well as the quality of predicted models was assessed. The results of the analysis of deacetylase inhibitor binding across different classes demonstrated their limited selectivity toward plant HDACs. Notable inhibitory selectivity was observed for SAHA, whereas trichostatin A, sodium butyrate, and cyclic hydroxamic acid derivatives acted predominantly as pan-HDACis (HDAC inhibitors). It was shown that sodium butyrate can bind within the catalytic pocket of deacetylases; however, its interaction is unstable and likely induces inhibition by triggering conformational changes. The structural analysis provided a detailed characterization of the shared and distinct features of the HDACs examined. HDAC10 from *O. sativa* was found to exhibit the highest structural similarity to HDA14 from *A. thaliana*, suggesting a potentially similar functional role and shared deacetylation substrates. Four key amino acid residues required for Zn²⁺ coordination in the active site were identified, including the 'XDXH' motif, which is critically important for catalytic activity. The results obtained enhance our understanding of the structural organization of plant HDACs, identify key determinants of their catalytic activity, and provide a foundation for the development of selective inhibitors and biotechnological strategies aimed at regulating plant growth and improving stress tolerance.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Bahram Sangani, N., Koetsier, J., Mélius, J., et al., A novel insight into neurological disorders through HDAC6 protein-protein interactions, *Sci. Rep.*, 2024, vol. 14, pp. 14666. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65094-1>

Bie, X.M., Dong, L., Li, X.H., Wang, H., Gao, X.Q., and Li, X.G., Trichostatin A and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat, *Plant Signal Behav.*, 2020, vol. 15, no. 12, pp. 1820681. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1820681>

Bigman, L.S., and Levy, Y., Stability effects of protein mutations: the role of long-range contacts. *J. Phys. Chem. B*, 2018, vol. 122, no. 49, pp. 11450–11459. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07379>

Castaco-Miquel, L., Nicolas, P., Pouzet, C., et al., HDC1-mediated salt response in Arabidopsis through LEA and MAF5 regulation, *New Phytol.*, 2024, vol. 241, no. 1, pp. 100–113. <https://doi.org/10.1111/nph.19165>

Chan, A.M., Mitchell, A., Grogan, L., Shapiro, P., and Fletcher, S., Histone deacetylase (HDAC) inhibitor specificity determinants are preserved in a class of dual HDAC/non-covalent proteasome inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 2024, vol. 104, pp. 117680 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117680>

Chen, C.Y., Tu, Y.T., Hsu, J.C., et al., Structure of Arabidopsis HISTONE DEACETYLASE15, *Plant Physiol.*, 2020, vol. 184, no. 3, pp. 1585–1600. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00604>

Choi, S.M., Song, H.R., Han, S.K., et al., HDA19 is required for the repression of salicylic acid biosynthesis and salicylic acid-mediated defense responses in Arabidopsis, *Plant J.*, 2012, vol. 71, no. 1, pp. 135–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04977.x>

Chung, P.J., Kim, Y.S., Jeong, J.S., Park, S.H., Nahm, B.H., and Kim, J.K. The histone deacetylase OsHDAC1 epigenetically regulates the OsNAC6 gene that controls seedling root growth in rice, *Plant J.*, 2009, vol. 59, no. 5, pp. 764–776. [10.1111/j.1365-313X.2009.03908.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03908.x)

Cui, Y., Ling, Y., Zhou, J., and Li, X., Interference of the histone deacetylase inhibits pollen germination and pollen tube growth in *Picea wilsonii* Mast. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 12, pp. e0145661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145661>

Curcio, A., Rocca, R., Alcaro, S., and Artese, A., The histone deacetylase family: structural features and application of combined computational methods, *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, vol. 17, no. 5, pp. 620. <https://doi.org/10.3390/ph17050620>

de Rooij, P.G.H., and Perrella, G., Kaiserli, E., and van Zanten, M., The diverse and unanticipated roles of histone deacetylase 9 in coordinating plant development and environmental acclimation, *J. Experim. Bot.*, 2020, vol. 71, no. 20, pp. 6211–6225. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa335>

Delcuve, G.P., Khan, D.H., and Davie, J.R., Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation:

- emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin. Epigenetics*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 5. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-5>
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., et al., Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors, *Nature*, 1999, vol. 401, no. 6749, pp. 188–193. <https://doi.org/10.1038/43710>
- Hartl, M., and Finkemeier, I., Functional significance of lysine acetylation in chloroplast proteins and photosynthetic regulation, *Plant Cell*, 2012, vol. 24, no. 12, pp. 4770–4783. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102210>
- Hartl, M., Fussl, M., Boersema, P.J., et al., Lysine acetylome profiling uncovers novel substrates of HDA14 in the chloroplast, *Plant Cell*, 2017, vol. 29, no. 11, pp. 2642–2660. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00393>
- He, S., Hao, Y., Zhang, Q., et al., Histone deacetylase inhibitor SAHA improves high salinity tolerance associated with hyperacetylation-enhancing expression of ion homeostasis-related genes in cotton, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 19, pp. 7105. <https://doi.org/10.3390/ijms21197105>
- Hoermayer, L., Montesinos, J.C., Mar, K., et al., HDAC inhibition promotes shoot regeneration through the ARF-LBD module. *Front. Plant Sci.*, 2024, vol. 15, pp. 1500573. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1500573>
- Holcomb, M., Santos-Martins, D., Tillack, A.F., and Forli, S., Performance evaluation of flexible macrocycle docking in AutoDock, *QRB Discov.*, 2022, vol. 3, pp. e18. <https://doi.org/10.1017/qrd.2022.18>
- Hsu, C.W., Shou, D., Huang, R., et al., Identification of HDAC inhibitors using a cell-based HDAC I/II assay, *J. Biomol. Screen.*, 2016, vol. 21, no. 6, pp. 643–652. <https://doi.org/10.1177/1087057116629381>
- Hou, J., Xiao, H., Yao, P., Ma, X., Shi, Q., Yang, J., Hou, H., and Li, L., Unveiling the mechanism of broad-spectrum blast resistance in rice: the collaborative role of transcription factor OsGRAS30 and histone deacetylase OsHDAC1, *Plant Biotechnol. J.*, 2024, vol. 22, no. 6, pp. 1740–1756. <https://doi.org/10.1111/pbi.14299>
- Kim, J.M., Park, J.H., Heo, J.O., et al., AtHDA7 is a catalytically inactive histone deacetylase essential for reproductive development in Arabidopsis. 2024, *Curr. Res. Plant Biol.*, vol. 5, pp. 100128. <https://doi.org/10.1016/j.crpb.2024.100128>
- Lee, S.J., Joung, Y.H., Lee, J.H., et al., HDA-2 of Trichoderma atroviride promotes Arabidopsis growth and stress resistance, *Plant Physiol.*, 2019, vol. 179, no. 4, pp. 1343–1360. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01377>
- Lochmanová, G., Ihnatová, I., Kuchařiková, H., et al., Different modes of action of genetic and chemical downregulation of histone deacetylases with respect to plant development and histone modifications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 20, pp. 5093 <https://doi.org/10.3390/ijms20205093>
- Luo, M., Wang, Y.Y., Liu, X., Yang, S., Lu, Q., et al., Arabidopsis histone deacetylase HDA15 associates with the transcription factor PIF1 to repress photosynthetic genes under dark conditions, *Plant Physiol.*, 2020, vol. 184, no. 3, pp. 1585–1600. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa067>
- Martinez, Ó., Arjones, V., González, M.V., and Rey, M., Histone deacetylase inhibitors increase the embryogenic potential and alter the expression of embryogenesis-related and HDAC-encoding genes in grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Mencía). *Plants (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 6, pp. 1164. <https://doi.org/10.3390/plants10061164>
- Pan, Q., Huang, R., Xiao, Q., et al., Inhibition of histone deacetylase in Arabidopsis root calli promotes de novo shoot organogenesis, *Front. Plant Sci.*, 2025, vol. 15, pp. 1500573. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1500573>
- Perrella, G., and Kaiserli, E., Light behind the curtain: photoregulation of nuclear architecture and chromatin dynamics in plants, *New Phytol.*, 2021, vol. 229, no. 3, pp. 991–996. <https://doi.org/10.1111/nph.17114>
- Porter, N.J., and Christianson, D.W., Structural insights into the catalytic mechanism of HDAC enzymes, *J. Biol. Chem.*, 2019, vol. 294, no. 18, pp. 6827–6840
- Rayevsky, A.V., Sharifi, M., Samofalova, D., et al., Structural and functional features of lysine acetylation of plant and animal tubulins, *Cell Biol. Int.*, 2019, vol. 43, no. 9, pp. 1040–1048. <https://doi.org/10.1002/cbin.10887>
- Rayevsky, A., Bulgakov, E., Sharifi, M., et al., In silico induced effect of N-ε-lysine acetylation on microtubule stability and subsequent interaction of microtubule-associated proteins, *Cell Biol. Int.*, 2023, vol. 47, no. 9, pp. 1547–1557. <https://doi.org/10.1002/cbin.12052>
- Rayevsky, A., Bulgakov, E., Blume, R., et al., Lysine Acetylation of Plant α-Tubulins: Scaling Up the Local Effect to Large System Transformations, *Proteins*, 2025, vol. 93, no. 10, pp. 1848–1861. <https://doi.org/10.1002/prot.26846>
- Rayevsky, A., Bulgakov, E., Stykhylias, M., et al., Structural Flexibility and Shape Similarity Contribute to Exclusive Functions of Certain Atg8 Isoforms in the Autophagy Process, *Mol. inf.*, 2025, vol. 44, no. 7, e202500025. <https://doi.org/10.1002/minf.70004>
- Robinson, A.C., Castaceda, C.A., Schlessman, J.L., and García-Moreno, E.B., Structural and thermodynamic consequences of burial of an artificial ion pair in the hydrophobic interior of a protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, vol. 111, no. 32, pp. 11685–11690. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402900111>

- Rybachuk, O., Rayevsky, A., Styhylias, M., et al., Computational and experimental identification of putative α TAT1 modulators: implications for nervous system function, *Frontiers pharm.*, 2025, vol. 16, 1654114. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1654114>
- Saharan, K., Baral, S., Shaikh, N.H., and Vasudevan, D., Structure-function analyses reveal Arabidopsis thaliana HDA7 to be an inactive histone deacetylase, *Curr. Res. Struct. Biol.*, 2024, vol. 7, pp. 100136. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2024.100136>
- Schmidt, T., Situ, A.J., and Ulmer, T.S., Structural and thermodynamic basis of proline-induced trans-membrane complex stabilization, *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, pp. 29809. <https://doi.org/10.1038/srep29809>
- Shukla, V.K., Siemons, L., Gervasio, F.L., and Hansen, D.F., Aromatic side-chain flips orchestrate the conformational sampling of functional loops in human histone deacetylase 8, *Chem. Sci.*, 2021, vol. 12, no. 27, pp. 9318–9327. <https://doi.org/10.1039/d1sc01929e>
- Styhylias, M.M., Rayevsky, O.V., and Blume, Y.B., Plant histone deacetylases: their classification and inhibitor search, *Cytol. Genet.*, 2024, vol. 58, pp. 385–394. <https://doi.org/10.3103/S0095452724050116>
- Sun, Y., Shi, Y., Li, C., and Shi, H., Histidine protonation behaviors on structural properties and aggregation properties of A β (1–42) mature fibril: approaching by edge effects, *J. Phys. Chem. B*, 2024, vol. 128, no. 30, pp. 7341–7349. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.4c02343>
- Tanaka, M., Kikuchi, A., and Kamada, H., The Arabidopsis histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination, *Plant Cell*, 2008, vol. 20, no. 5, pp. 1231–1248. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057760>
- Tanaka, M., Kikuchi, A., and Kamada, H., The Arabidopsis histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination, *Plant Physiol.*, 2008, vol. 146, no. 1, pp. 149–161. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111674>
- Tian, L., and Chen, Z.J., Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, no. 1, pp. 200–205. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.200>
- Tran, H.T., Nimick, M., Uhrig, R.G., et al., Arabidopsis thaliana histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3, *Plant J.*, 2012, vol. 71, no. 2, pp. 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2012.04984.x>
- Vannini, A., et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, no. 42, pp. 15064–15069
- Venturelli, S., Belz, R.G., Kdmper, A., et al., Plants release precursors of histone deacetylase inhibitors to suppress growth of competitors, *Plant Cell*, 2015, vol. 27, no. 11, pp. 3175–3189. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00585>
- Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., et al., MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation, *Protein Sci.*, 2018, vol. 27, no. 1, pp. 293–315. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>
- Xu, Y., Miao, Y., Cai, B., et al., A histone deacetylase inhibitor enhances rice immunity by derepressing the expression of defense-related genes, *Front. Plant Sci.*, 2022, vol. 13, pp. 1041095. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1041095>
- Yoshida, M., Kudo, N., Kosono, S., and Ito, A., Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases, *Proc. Japan Acad. Ser. B*, 2017, vol. 93, no. 5, pp. 297–321. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.019>
- Yu, C.W., Liu, X., Luo, M., et al., HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 2011, vol. 156, no. 1, pp. 173–184. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174417>
- Yuan, L., Song, Y., Jing, Y., et al., HDA15 is a negative regulator of thermomorphogenesis in Arabidopsis, *Front. Plant Sci.*, 2023, vol. 14, pp. 1296767. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1296767>
- Yusuf, A.P., Abubakar, M.B., Malami, I., et al., Zinc metalloproteins in epigenetics and their crosstalk, *Life (Basel)*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 186. <https://doi.org/10.3390/life11030186>
- Zhang, H., Guo, F., Qi, P., et al., OsHDA710-mediated histone deacetylation regulates callus formation of rice mature embryo, *Plant Cell Physiol.*, 2020, vol. 61, no. 9, pp. 1646–1660. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa086>
- Zhang, Y., et al., Zinc-binding groups and inhibition mechanisms of HDAC inhibitors: Structural basis and drug design implications, *Front. Chem.*, 2020, vol. 8, pp. 62
- Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., et al., Histone deacetylase19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis, *Plant Cell*, 2005, vol. 17, no. 4, pp. 1196–1204. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028514>

Надійшла в редакцію 15.10.2025
Після доопрацювання 05.11.2025
Прийнята до друку 18.03.2026