

УДК 577.15.024.025.541.64

©Коллектив авторов

**БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИПЕРРАЗВЕТВЛЕННОГО
ПОЛИОЛА Boltorn H20 И ПОЛИКАРБОКСИ Boltorn H20
ПО ОТНОШЕНИЮ К ИНДУЦИРУЕМОЙ СЕКРЕТОРНОЙ
АСПАРАГИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЕ *CANDIDA ALBICANS***

**М.П. Кутырева^{1*}, Н.А. Улахович¹, Г.Ш. Усманова¹, Г.А. Кутырев²,
Н.И. Глушко³, Е.В. Халдеева³**

¹Казанский государственный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18;
тел.: (843)2315302; эл. почта: mkutyreva@mail.ru,

²Казанский государственный технологический университет

³Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

Установлено, что гиперразветвлённый полиол Boltorn H20, и синтезированный на основе полифункциональной наноплатформы, поликарбокси Boltorn H20 оказывают влияние на каталитическую активность индуцируемой секреторной протеиназы *Candida albicans* (*C. alb.*). Результаты, полученные при изучении каталитической активности индуцируемой протеиназы *C. alb.* по отношению к гемоглобину в присутствии Boltorn H20 показывают, что преимущественно наблюдается эффект активации. Эффект ингибирования значительно слабее и носит точечный характер. Переход к карбоксильному производному приводит к сдвигу активационного эффекта в область высоких концентраций (1×10^{-3} - 5×10^{-4} М), однако этот эффект значительно сильнее (140%). Так же оценены кинетические параметры ферментативного протеолиза гемоглобина (максимальная скорость ферментативной реакции (V_m), кажущаяся константа Михаэлиса (K_m)) определены типы и рассчитаны константы в присутствии Boltorn H20 и поликарбокси Boltorn H20

Ключевые слова: гиперразветвленный полиол Boltorn H20, протеиназа *Candida albicans*, ферментативный катализ, кинетические параметры.

ВВЕДЕНИЕ. Применение наноразмерных структурированных макромолекул в разработке лекарственных препаратов и диагностических систем в настоящее время составляет значительную часть исследований, проводимых в области биомедицинской химии. В этом плане гиперразветвленные полимеры (ГРП), обладающие полифункциональностью, высоким локальным удельным весом активных групп в сочетании с достаточно простыми и экономичными методиками их получения, несомненно, привлекательны для химии лекарственных препаратов [1-4].

Возможности функционирования координационно активных ГРП в качестве наноконтейнеров, инкапсулирующих целевые соединения или наноплатформ, удерживающих молекулы “гостя” или функциональные группы на поверхности обуславливает их перспективность в качестве высокоэффективных нанолекарственных антираковых, бактерицидных [5], антивирусных [6-8], антимикотических [9] препаратов и проявляющих реагентов для томографии [10].

Данная работа является продолжением исследований [11], направленных на поиск соединений, способных эффективно и специфично управлять каталитической активностью аспарагиновых протеиназ *Candida albicans*.

* - адресат для переписки

БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИПЕРРАЗВЕТВЛЕННОГО ПОЛИОЛА

В этом плане нетоксичные гиперразветвленные полиолы серии “Boltorn H” ($LD_{50} \approx 2000$ мг/кг) являются перспективными объектами биомедицинского назначения, в которых в качестве биоактивного соединения выступает полиидентатная наноплатформа полиола. К сожалению, количество работ, посвящённых биохимической активности Boltorn весьма ограничено, и в основном касается инкапсулирования ими низкомолекулярных лекарственных препаратов [12] или биоактивности модифицированных полиолов [13]. Рассмотрение возможностей ГРП Boltorn H20 и его функционализированных производных в качестве модуляторов активности ферментативной системы одного из самых распространенных патогенных грибов – *Candida albicans* представляется впервые и может быть весьма полезным в разработке антимикотических препаратов нового поколения.

МЕТОДИКА. В работе использовали ГРП второй генерации Boltorn H20 (BH20) фирмы Perstorp Speciality Chemicals AB, Швеция с 16 гидроксильными группами, имеющий молекулярный вес 1747 г/моль, гидроксильное число 515 мг/г KOH, $t_{\text{плавления}} = 80-110^\circ\text{C}$.

В синтезе использовали соли квалификации “ч.д.а.”: NaHCO_3 . Так же были использованы органические растворители: диэтиловый эфир $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$, ацетон $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, очищенные согласно стандартным методикам [14]. Для определения процентного содержания карбоксильных групп применяли водно-ацетоновый раствор KOH (с объёмной долей H_2O 50%).

Биологическая активность гиперразветвленного полимера BH20, его карбоксильного производного и комплекса изучена по отношению к индуцируемой секреторной аспарагиновой протеиназе *Candida albicans* (SAP *C. alb*). Методика выделения, очистки и характеристики фермента описаны в работе [11]. Исходная концентрация SAP *C. alb*. в разведении 1:10 составила $1,0 \times 10^{-6}$ моль/л.

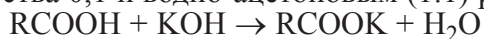
В качестве субстрата использовали бычий гемоглобин (Hb) марки “АГАТ-МЕД”, $c_{\text{Hb}} = 123$ г/л (с содержанием железа не менее 0,3%, $M = 64,250$ кДа). Исходные растворы субстрата получали растворением точной навески в бидистиллированной воде, исходная концентрация Hb составила $1,0 \times 10^{-5}$ моль/л. Растворы субстрата с более низкой концентрацией получали методом последовательного разбавления, и хранили при температуре $+4-5^\circ\text{C}$ не более 1 суток.

В работе использовали буферные растворы с $\text{pH} = 1,08-8,00$, приготовленные из фиксанных растворов по стандартным методикам. Измерения pH проводились при $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$ на pH метре - pH 150 М с точностью 0,01 логарифмической единицы.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Lambda 35 (“Perkin Elmer”, Великобритания) в области длин волн 190-900 нм, при $T = 36 \pm 0,01^\circ\text{C}$ с использованием термостатирующей системы, включающей термостатируемый держатель кювет, проточный термостат Julabo MB-5A и термостат Пельте РТР-1. Для измерения использовали кварцевые кюветы, толщина которых равна 1 см. Точность измерения оптической плотности (A) составляла $\pm 1\%$.

Модификация Boltorn H20 янтарным ангидридом. К нагретому раствору 5,26 г BH20 в 21 мл безводного ацетона добавляли 4,93 г янтарного ангидрида в мольном соотношении 1:16, затем добавляли еще 10 мл ацетона. Смесь перемешивали при температуре кипения растворителя ($56,5^\circ\text{C}$) в течение 12 часов. После охлаждения смесь обрабатывали диэтиловым эфиром, образовавшийся белый продукт отделяли и высушивали в вакууме. Получили 5,0 г (55,53%) поликарбоксиBoltorn H20 BH20(COOH) в виде белого аморфного вещества. Данные элементного анализа $\text{C}_{123}\text{H}_{172}\text{O}_{81}$ (2944): найдено C – 51,42%, H – 5,77%; вычислено C – 50,13%, H – 5,84%.

Определение карбоксильных групп и кислотного числа. Содержание карбоксильных групп определяли титрованием растворённой навески исследуемого вещества 0,1 н водно-ацетоновым (1:1) раствором щелочи по методике [15].



В колбу помещали навеску исследуемого вещества, взвешенного с точностью до 0,0002 г, добавляли 15 мл растворителя (водно-ацетоновой смеси 1:1) и после растворения навески титровали из микробюретки водно-ацетоновым раствором щелочи ($c_{\text{KOH}}=0,1$ моль/л) в присутствии фенолфталеина до появления розовой окраски. Анализировали две пробы, параллельно проводили контрольный опыт с тем же количеством растворителя. Из полученных результатов принимали среднее значение. Содержание карбоксильных групп X (в %) вычисляют по формуле:

$$X = (V_1 - V_2) \times F \times 0,0045 \times 100/g,$$

где V_1 – объём раствора щелочи, израсходованного на титрование рабочей пробы, мл.; V_2 – объём раствора щелочи, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл.; F – поправочный коэффициент раствора щёлочи; 0,0045 – количество COOH-групп, соответствующее 1 мл раствора щёлочи ($c_{\text{KOH}}=0,1$ моль/л), г; g – навеска вещества, г.

Кислотное число характеризуется количеством KOH (в мг), которое необходимо для нейтрализации карбоксильных групп, содержащихся в 1 г анализируемого вещества.

Кислотное число (КЧ) рассчитывают по формуле:

$$\text{КЧ} = (V_1 - V_2) \times F \times 0,00561 \times 1000/g,$$

где 0,00561 – титр раствора KOH, г/мл.

Определение протеолитической активности SAP C. alb по отношению к гемоглобину. Активность фермента (А) определяли в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции по сравнению с некаталитической. Скорость реакции указывали как изменение концентрации субстрата (мг/л) за единицу времени (мин).

В мерную колбу на 5 мл вводили 0,52 мл раствора гемоглобина (Hb) с концентрацией $1,914 \times 10^{-5}$ моль/л (c_{Hb} в рабочем растворе – 2×10^{-6} моль/л или 123×10^3 мкг/л); 0,01 мл SAP C. alb. (концентрация в исследуемом растворе $2,0 \times 10^{-9}$ М). Доводили до метки буферным раствором с pH=4,10. Раствор перемешивали и переносили в кварцевую спектрофотометрическую кювету. После инкубирования в течение от 20 до 40 минут при $T=25^\circ\text{C}$ регистрировали электронный спектр поглощения полученного раствора в области длин волн 190-900 нм и измеряли интенсивность полосы поглощения при длине волны $\lambda=406$ нм.

Оставшуюся после взаимодействия с протеазой C. alb. в растворе концентрацию субстрата определяли по градуировочному графику зависимости величины поглощения от концентрации гемоглобина (уравнение 1). В качестве растворов сравнения использовали растворы без субстратов.

$$Y = (0,01226 \pm 0,01776) + (488403,52 \pm 12049,54) \times c_{\text{Hb}}; R=0,98912, \quad (1)$$

Активность фермента определяли по формуле :

$$A = \frac{\Delta C_{\text{Hb}}}{t},$$

где A – активность, t – время, $\Delta C_{\text{Hb}} = C_{\text{max}}(\text{Hb}) - C_{\text{ост}}(\text{Hb})$

Расчёт кинетических параметров реакции. При обработке данных для расчёта кинетических параметров наиболее распространённым способом является линеаризация экспериментальных данных в координатах ($1/V_0$, $1/[S]_0$) Лайнуивера–Берка [16]. Для расчета констант ингибирования (K_i) и активации (K_a) использовали формулы, приведенные в работе [17]. График зависимости в координатах Лайнуивера – Берка имеет вид прямой линии, пересекающей ось абсцисс и ординат в точках – $1/K_{m(\text{каж})}$ и $1/V_m$ соответственно (рис. 1).

Начальную скорость реакции при данной текущей концентрации субстрата находили графическим дифференцированием кинетической кривой в зависимости оптической плотности раствора субстрата в присутствии фермента от времени (рис. 2).

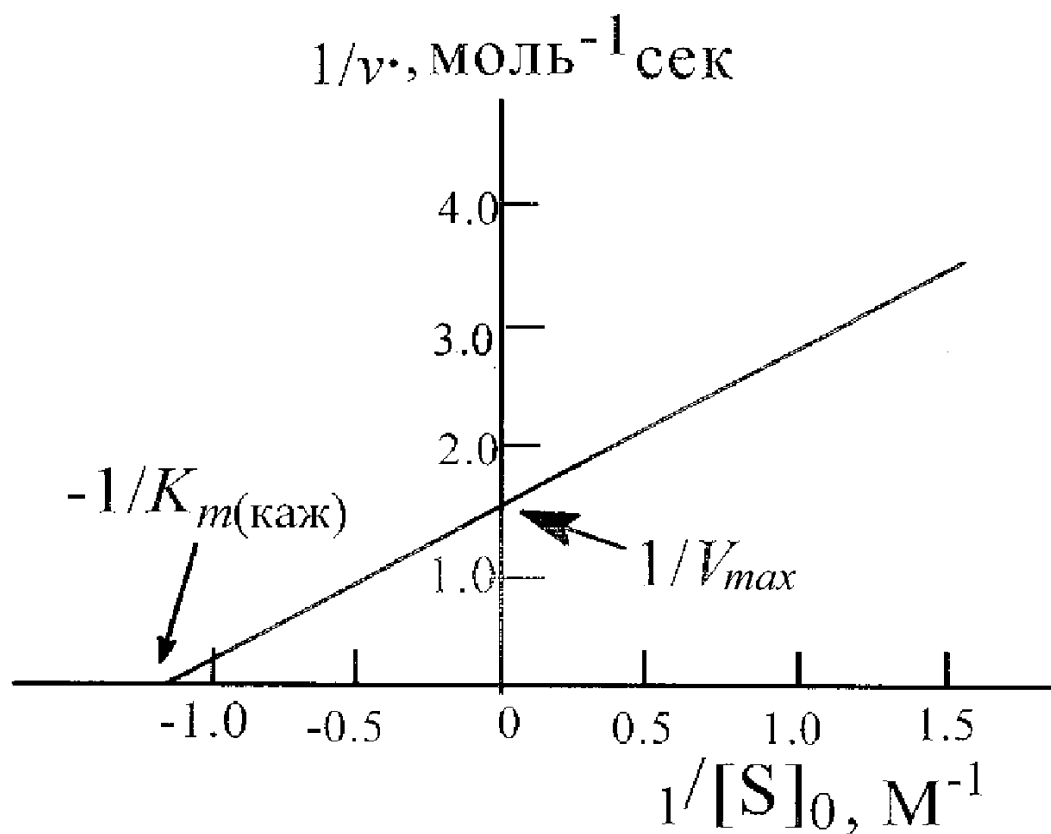


Рисунок 1.

Определение максимальной скорости и кажущейся константы Михаэлиса в координатах Лайнуивера-Берка.

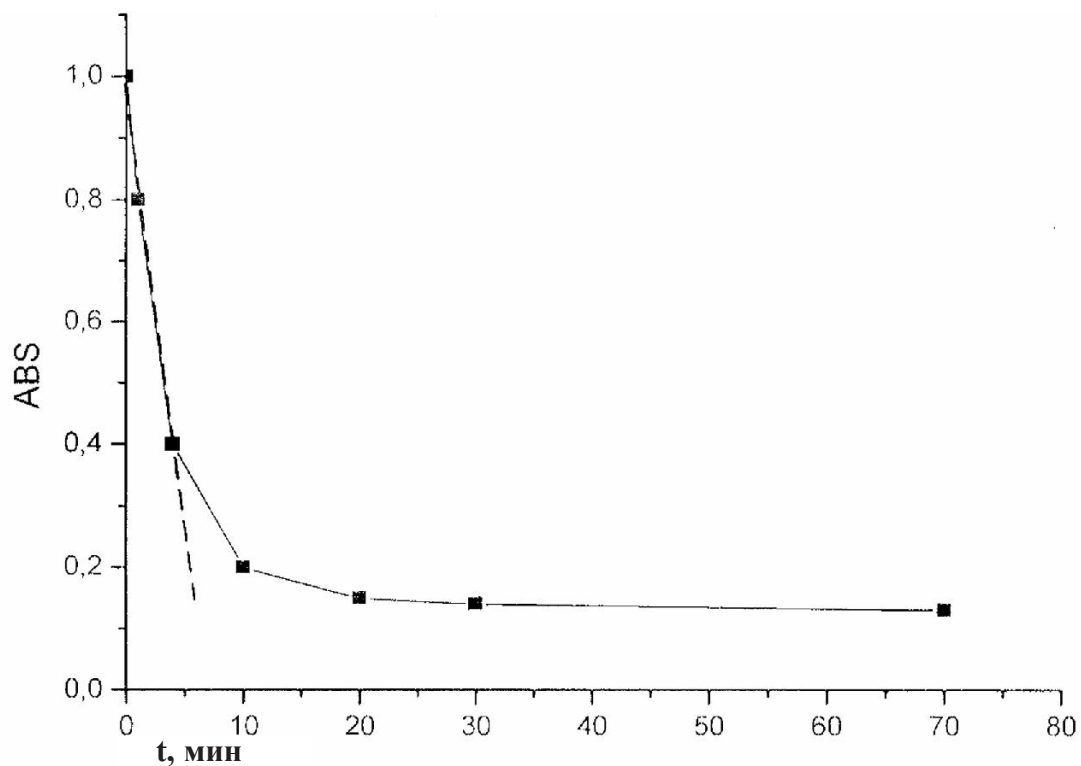


Рисунок 2.

Определение начальной скорости реакции при данной текущей концентрации субстрата в присутствии фермента (зависимость оптической плотности раствора субстрата от времени).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Идеальная структура гиперразветвлённого полиола ВН20 представлена на рисунке 3. Установлено, что взаимодействие ВН20 с янтарным ангидридом в ацетоне протекает не в соотношении 1:16. Значения процентного содержания карбоксильных групп и кислотных чисел исходного соединения ВН20 и продукта реакции ВН20(СООН), представленные в таблице 1 позволяют утверждать, что только 75% (12 из 16) гидроксогрупп ВН20 вступают в реакцию замещения с янтарным ангидридом и реакция функционализации может быть представлена схемой 1:

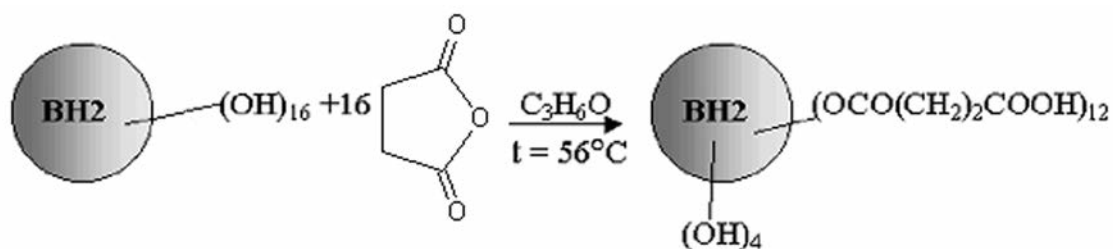


Схема 1.

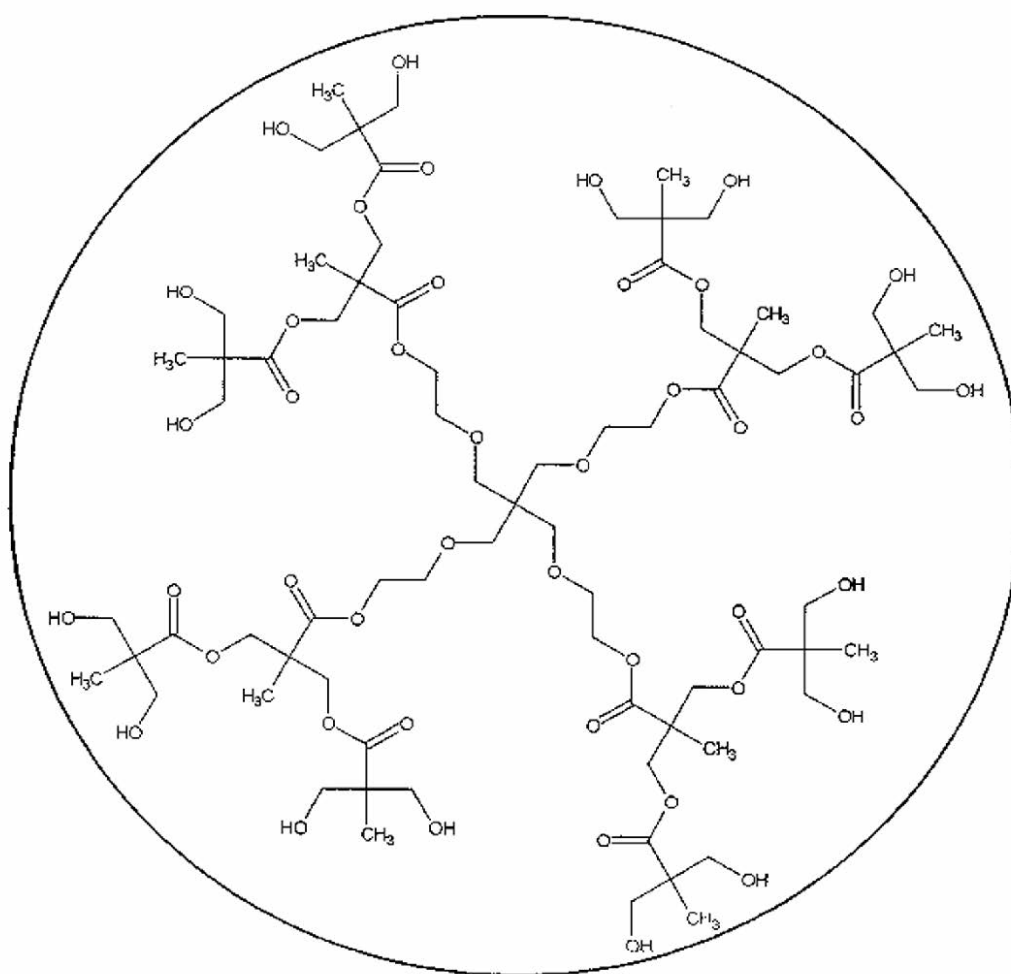


Рисунок 3.

Идеальная структура Boltorn H20.

БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИПЕРРАЗВЕТВЛЕННОГО ПОЛИОЛА

Таблица 1. Кислотное число (КЧ) и процентное содержание карбоксильных групп (COOH, %) в ВН20 и карбоксилированном ВН20(COOH).

Соединение	Кислотное число (КЧ)	COOH, %	
		Теоретич.	Эксперим.
ВН20	2,04±0,02	0	0,09±0,01
ВН20(COOH)	196,37±0,06	21,5	16,02±0,04

Активность индуцируемой *SAP C. alb.* является непосредственной причиной возникновения циркулирующих микозов *Candida* [11]. При наличии этого заболевания микотическая культура определяется в крови человека, а в функционирование *SAP C. alb.* входит разрушение гемоглобина. Поэтому, оценка влияния ГРП ВН20, поликарбоксиВН20 в качестве модуляторов ферментативной активности индуцируемой *SAP C. alb.* по отношению к гемоглобину позволит контролировать динамику развития циркулирующих микозов *Candida*.

Установлено, что присутствие ГРП ВН20 и поликарбоксиВН20 в различных концентрациях оказывает влияние на протеолитическую активность *SAP C. alb.* по отношению к Нб. В диаграмме (рис. 4) и таблице 2 представлена каталитическая активность *SAP C. alb.* в присутствии изучаемых соединений в различных концентрациях в оптимальных условиях ферментативного гидролиза ($c_{SAP}=2,0 \times 10^{-9}$ М, $c_S=126$ мг/л, pH=4,1, $t_{инк}$, 20 мин, $A_0=0,98 \pm 0,2$ мг/л×мин).

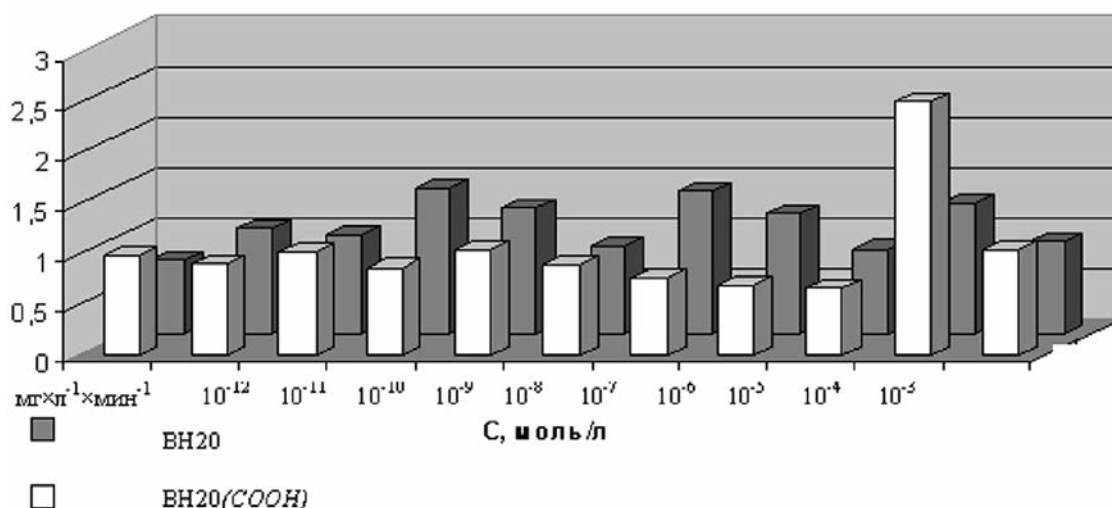


Рисунок 4.

Зависимость протеолитической активности *SAP C. alb.* в присутствии соединений ВН20, ВН20(COOH) в диапазоне концентраций 1×10^{-3} - 1×10^{-12} М.

Таблица 2. Каталитическая активность индуцируемой *SAP C. alb.* по отношению к гемоглобину в присутствии эффекторов.

Эффектор	с, М	Эффект
ВН20	1×10^{-3} - 5×10^{-4} , 5×10^{-5} - 5×10^{-7} , 5×10^{-8} - 5×10^{-12}	Активация (15-55%)
	1×10^{-4} , 1×10^{-7} , 1×10^{-12}	Ингибирование (max 20%)
ВН20(COOH) ₁₂	1×10^{-3} - 5×10^{-4}	Активация (max 140%)
	1×10^{-4} - 1×10^{-12}	Ингибирование (max 36%)

Результаты, полученные при изучении каталитической активности индуцируемой *SAP C. alb.* по отношению к гемоглобину в присутствии ГРП ВН20 показывают, что преимущественно наблюдается эффект активации. Эффект ингибирования значительно слабее и носит точечный характер. Переход к карбоксильному производному приводит к сдвигу активационного эффекта в область высоких концентраций (1×10^{-3} - 5×10^{-4} М), однако этот эффект значительно сильнее (140%). Понижение концентрации ВН20(СООН) приводит к ингибирующему эффекту во всем диапазоне концентраций.

Описание биохимического процесса с участием фермента требует проведения кинетических исследований взаимодействий в изучаемой системе в отсутствие и присутствии эффекторов.

По результатам кинетических исследований рассчитаны максимальная скорость ферментативной реакции (V_m), кажущаяся константа Михаэлиса (K_m) и константы эффектов в присутствии и отсутствии эффекторов ВН20, ВН20(СООН) (табл. 3).

Таблица 3. Кинетические параметры ферментативной реакции гидролиза гемоглобина в присутствии *SAP C. alb.* и эффекторов ВН20, ВН20(СООН) (n=5, p=0,95).

Эффектор	$c, \text{М}$	$V_m \times 10^2, \text{(моль} \times \text{л)/с}$	$K_m \times 10^6, \text{моль/л}$	$K_3, \text{моль/л}$	Тип эффекта
нет	0	0,79	1,16	-	-
ВН20	1×10^{-4}	4,02	1,93	$1,33 \times 10^{-5}$	Псевдоингибирование
	1×10^{-7}	2,85	1,35	$3,11 \times 10^{-8}$	
	5×10^{-10}	5,14	2,78	$3,41 \times 10^{-11}$	Двухпараметрически рассогласованная активация
ВН20(СООН)	1×10^{-4}	17,28	0,51	$4,88 \times 10^{-3}$	Двухпараметрически согласованная активация
	5×10^{-9}	0,33	0,24	$4,98 \times 10^{-10}$	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование

Сочетание двух классификаций эффектов - традиционной “конкурентной” и менее используемой “параметрической” [16-18] позволило описать наблюдаемые эффекты и предложить схемы протекания реакции ферментативного гидролиза гемоглобина в присутствии ВН20, ВН20(СООН) в качестве модуляторов ферментативной активности.

Присутствие в фермент – субстратной системе ВН20 характеризуется двумя типами эффектов: эффектом псевдоингибирования и эффектом двухпараметрически рассогласованной активации. Эффект псевдоингибирования носит точечный характер ($c_{\text{ВН20}} = 1 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-12}$ М) характеризуется уменьшением сродства фермента к субстрату и увеличением максимальной скорости реакции, что более типично для процессов активации. Однако, первичный эффект проявляется в уменьшении начальной скорости фермент – субстратной реакции $v_1 < v_0$.

БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИПЕРРАЗВЕТВЛЕННОГО ПОЛИОЛА

и выполняется во всём интервале обратных концентраций субстрата. Это позволяет отнести данный эффект к ингибированию согласно схеме 2 (преимущественно протекающие процессы выделены жирным шрифтом)

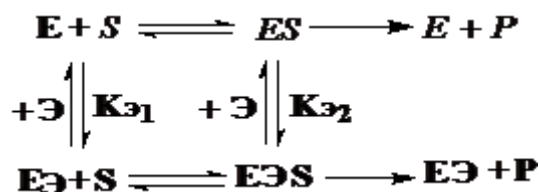


Схема 2.

Эффект двухпараметрически рассогласованной (бесконкурентной) активации наблюдается в широком интервале концентраций ВН20 и характеризуется ослаблением связи фермента с субстратом и увеличением как максимальной, так и начальной скоростей реакции во всем диапазоне концентраций субстрата. Предпочтительное образование промежуточных комплексов ЕЭ и ЕЭС приводит к образованию продукта сразу по двум стадиям (схема 3):

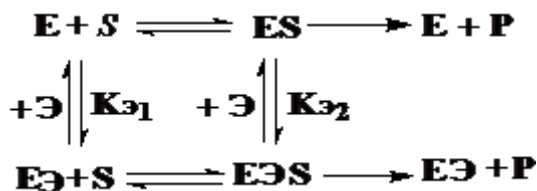


Схема 3.

В присутствии ВН20(COOH) наблюдается эффект двухпараметрически рассогласованного (бесконкурентного) ингибирования. Этот тип эффекта характеризуется увеличением сродства фермента к субстрату и уменьшением максимальной скорости ферментативной реакции. Пользуясь параметрами “конкурентной” классификации эффектов, можно сказать, что в этом случае одновременно и в одинаковой степени уменьшаются каталитическая константа, определяющая скорость распада фермент – субстратного комплекса с образованием продукта реакции, и кажущаяся константа Михаэлиса. Можно предложить следующую схему процессов, согласно которой в присутствии эффектора часть фермента инактивируется за счет образования комплекса ЕЭ, что приводит к уменьшению скорости ферментативной реакции (схема 4).

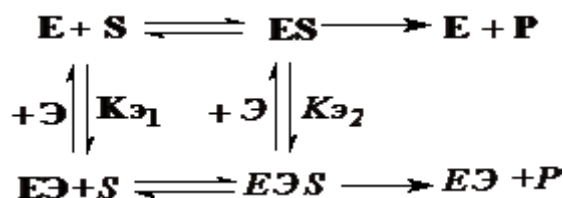


Схема 4.

И наиболее ярко для поликарбоксиволторна Н20 проявляется эффект двухпараметрически согласованной активации. Присутствие функционализированного производного в фермент-субстратной системе приводит и к усилению связывания фермента с субстратом и к увеличению скорости ферментативной реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, коммерческий полиол ВН20 и синтезированный поликарбоксиполиол ВН20(СООН) проявляют биохимическую активность по отношению к индуцируемой секреторной аспарагиновой протеиназой *Candida albicans*. Гидрофобность данных соединений обеспечивает удерживание активной макромолекулы на поверхности фермента, и мембранную проницаемость соединений. Особенности структуры и полидентатность функционализированной нано платформы ВН20(СООН) позволяют в дальнейшем использовать полученное соединение для дизайна лекарственных препаратов, направленных на угнетение микозов *Candida* и обладающих кооперативным ингибирующим эффектом носителя – макромолекулы и соединения-“гостя”. Впервые обнаруженный активирующий эффект макроплатформы Boltorn H20, усиливающийся при переходе к поликарбоксиBoltorn заслуживает пристального внимания, детального изучения и может быть использован в разработке противовирусных препаратов с усиленной протеолитической функцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Teertstra S.J. (2004) J. Prog. Polym. Sci., **29**, 277-327.
2. Gao G. (2004) J. Prog. Polym. Sci., **29**, 183-275.
3. Yates C.R., Hayes W. (2004) Eur. Polym. J., **40**, 1257-1281.
4. Королев Г.В., Бубнова М.Л. (2006) Гиперразветвленные полимеры – новый мощный стимул дальнейшего развития области трехмерной полимеризации и революция в полимерном материаловедении, ИПХФ РАН, Черноголовка.
5. Hansen H.C., Haataja S., Finne J., Magnusson G. (1997) J. Am. Chem. Soc., **119**, 6974–6979.
6. Bourne N., Stanberry L.R., Kern E.R., Holan G., Matthews B., Bernstein D.I. (2000) Antimicrob. Agents Chemother., **44**, 2471–2474.
7. Gong Y., Matthews B., Cheung D., Tam T., Gadawski I., Leung D., Holan G., Raff J., Sacks S. (2002) Antivir. Res., **55**, 319–329.
8. Witvrouw M., Fikkert V., Pluymers W., Matthews B., Mardel K., Schols D., Raff J., Debyser Z., DeClercq E., Holan G. (2000) Mol. Pharmacol., **58**, 1100–1108.
9. Nagahori N., Lee R.T., Nishimura S., Page D., Roy R., Lee Y.C. (2002) Chem. Bio. Chem., **3**, 836–844.
10. Boas U., Heegaard P.M.H. (2004) Chem. Soc. Rev., **33**, 43–63.
11. Кутырева М.П., Галимжанова Р.Р., Улахович Н.А., Глушко Н.И. (2007) Биомед. химия, **53**(1), 72-85.
12. Arce E., Nieto P., Diaz V., Castro R.G., Bernard A., Rojo J. (2003) Bioconjugate Chem., **14**(4), 817-823.
13. Zou J., Shi W., Wang J., Bo J. (2005) Macromol. Biosci., **5**(7), 662-668.
14. Органикум. Практикум по органической химии (1979) Мир, М.
15. Торопцева А.М., Белогородская К.В., Бондаренко В.М. (1972) Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений, Химия, М.
16. Березин И.В., Клесов А.А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, МГУ, М.
17. Крупянюк В.И. (1990) Векторный метод представления ферментативных реакций, Наука, М.
18. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. (1999) Практический курс. Биокинетика., ФАИР-ПРЕСС, М.

Поступила: 11. 03. 2009.

BIOCHEMICAL ACTIVITY HYPERBRANCHED POLIOL Boltorn H20 AND
POLYCARBOXYBoltorn H20 IN RELATION TO ASPARTIC PROTEINASE
OF *CANDIDA ALBICANS*

M.P. Kutyreva¹, N.A. Ulakhovich¹, G.Sh. Usmanova¹, G.A. Kutyr², N.I. Glushko³, E.V. Khaldeeva³

¹Kazan State University, Kremlevskaya st., 18, Kazan, 420008 Russia; tel.: (843) 2315302;
e-mail: mkutyreva@mail.ru

²Kazan State Technological University

³Kazan Scientific Research Institute Epidemiology and Microbiology

Hyperbranched polyol Boltorn H20 and polycarboxyBoltorn H20 synthesized on its multifunctional nanoscaffold influence catalytic activity of aspartic proteinase *Candida albicans* (*C. alb.*). The results of study catalytic activity proteinase *C. alb.* in relation to hemoglobin at presence Boltorn H20 show, that the effect of activation is mainly observed. The inhibition effect much more poorly also has dot character. PolycarboxyBoltorn H20 render activating effect in area of high concentration (1×10^{-3} - 5×10^{-4} M), however this effect is stronger (140%). A kinetic parameters enzyme proteolysis of hemoglobin (the maximal speed (V_m) and Mikhaelis constant (K_m)) are estimated, seeming types are certain and constants at presence Boltorn H20 and polycarboxyBoltorn H20 are calculated.

Key words: hyperbranched poliol Boltorn H20, proteinase *Candida albicans*, enzyme catalysis, kinetic parameters.