

# Benzoyilkolin, İndol-3-asetik Asit ve İnsan Serum Butirilkolinesterazı Etkileşimleri

[Benzoylcholine, Indole-3-acetic And Human Serum Butyrylcholinesterase Interactions]

Ebru Bodur, A. Neşe Çokuğraş

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim dalı, 06100, Ankara.

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

Ebru Bodur

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim dalı,  
06100, Ankara.  
Tel: +90 312 3245885  
Fax: +90 312 3111088  
e-posta: ebodur@hacettepe.edu.tr

Kayıt tarihi 11 Ağustos 2006; kabul tarihi 17 Kasım 2006  
[Received 11 August 2006; accepted 17 November 2006]

## ÖZET

Çalışmamızda insan serum butirilkolinesterazı ile indol-3-asetik asidin kinetik etkileşimini incelemeyi amaçladık. İnsan serumundan saflaştırılan butirilkolinesteraz ile substrat olarak benzoyilkolin kullanılarak yapılan kinetik incelemelerde  $K_m$  değeri  $14.22 \pm 2.97 \mu M$  olarak hesaplandı. Doğrusal bir Hill grafiği elde edildi ve Hill sabiti  $n_H = 0.95$  olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre enzim, substrat olarak benzoyilkolin ile Michaelis-Menten kinetiğine uyan bir davranış göstermektedir. Artan benzoyilkolin derişimleri varlığında yapılan inhibisyon çalışmaları ile, indol-3-asetik asidin etki mekanizmasının nonkompetitif tipte inhibisyon olduğu saptandı ve non-lineer regresyon analizi ile  $K_i$  değeri  $1.86 \pm 0.27 mM$  bulundu. Daha önce butirilkolinesteraz ve indol-3-asetik asit ile yaptığımız bir çalışmada, substrat olarak butiriltiyokolin kullanıldığında indol-3-asetik asidin lineer karışık tipte inhibitör davranışı gösterdiğini tespit edilmiştir. İki substratın farklı kinetik davranış göstermesinin nedeni, butiril grubu kıyasla daha büyük hidrofobik hacim kaplayan benzoyil grubun aktif merkezdeki hidrofobik cebe daha güçlü bağlanması, buna karşılık butiril grubun bağlanmasının indol-3-asetik tarafından engellenmesi olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Benzoyilkolin, butirilkolinesteraz, indol-3-asetik asit, inhibisyon,

## ABSTRACT

In this study we studied the kinetic interaction of indole-3-acetic acid with human serum butyrylcholinesterase. Butyrylcholinesterase was purified from human serum and the benzoylcholine kinetics was analyzed. The enzyme had a  $K_m$  value of  $14.22 \pm 2.97 \mu M$ . The Hill plot was linear with a value of  $n_H = 0.95$ , displaying that the enzyme follows Michaelis-Menten kinetics with regard to benzoylcholine. Through inhibition studies, indole-3-acetic acid was found to be a noncompetitive inhibitor for human serum butyrylcholinesterase with benzoylcholine as substrate. The  $K_i$  value was calculated as  $1.86 \pm 0.27 mM$ . In our previous study on human serum butyrylcholinesterase using butyrylthiocholine as substrate, indole-3-acetic acid was found to be a linear-mixed type inhibitor. This difference in kinetic behavior with regards to two different substrates could arise from the tighter binding of the more bulky and hydrophobic benzoyl group to the hydrophobic pocket of the active site gorge rather than the butyryl group and that the binding of this butyryl group could be sterically hindered by the indole-3-acetic acid.

**Key Words:** Benzoylcholine, butyrylcholinesterase, indole-acetic acid, inhibition

## GİRİŞ

Kolinesteraz enzim ailesi, asetilkolinesteraz (AChE, E.C.3.1.1.7) ve butirikolinesteraz (BChE, E.C. 3.1.1.8) olmak üzere çeşitli canlılarda yaygın olarak bulunan ve hem genetik dizilimleri hem de üç boyutlu protein yapıları açısından benzerlik gösteren iki farklı enzimden oluşur (1). AChE, kolinerjik sinir iletiminin sonlandırılmasında görev alır. BChE'nin ise gerçek işlevi henüz tanımlanamamıştır. Aynı monomerin oluşturduğu tetramerik yapıdaki serum BChE'si, ester bağı ve amid bağı içeren bileşikler parçalayabilmesi nedeni ile yabancı bileşiklere karşı korunmada öncülük eden biyolojik çöpçü enzim olarak da adlandırılır (2,3). Özellikle günümüzde savaş silahı olarak kullanılan organofosfat veya karbamat yapılı sinir gazları ve insektisit olarak kullanılan benzer yapılı kimyasallar ile zehirlenmelerde, BChE profilaktik amaçla kullanılmaktadır (1,4). Kolinesteraz inhibitörleri, sadece savaşlarda kullanılan kimyasal terör silahı değil, Alzheimer, myastenia gravis veya glom gibi hastalıklarda da ilaç olarak işlev görürler (5-8). Ancak her iki kolinesteraz enzimine birden inhibisyon etkisi gösteren maddelerin ilaç olarak kullanımı uygun değildir. AChE ve BChE'nin yapısal benzerliği, özgül inhibitör geliştirme çabalarını zorlaştırmasına rağmen özgül kolinesteraz inhibitörü tasarımı, ilaç geliştirilmesinde büyük önem taşır.

Bitki büyüme hormonu sınıfına giren bileşikler arasında yer alan indol-3-asetik asit (IAA), bitki serotoninini olarak da adlandırılır (9) (Şekil 1). IAA, bitki kökenli bir bileşik olmasına rağmen insanlarda kan, serebrospinal sıvı gibi sıvılarda da bulunur (10,11). IAA miktarının insanlarda serotonin ve triptofan metabolizmasının bozulduğu hastalıklarda arttığı rapor edilmiştir (10-12). Ayrıca son dönemde bitki peroksidadları ile birlikte IAA kullanımının yeni bir kanser tedavi yöntemi olabileceğine dair çalışmalar da vardır (13).

Pestisit olarak veya diğer tarım zararlılarıyla mücadelede kullanılan kimyasalların BChE'ye etkilerini araştırdığımız daha önceki çalışmalarımızda, substrat olarak açiltiyokolin türevleri kullanıldığında, IAA'nın farklı türlerden elde edilen BChE'ler üzerinde inhibitör etkisi olduğunu saptamıştık (14,15). Bu çalışmada ise insan serum BChE'si ile IAA'nın kinetik etkileşimini, substrat olarak benzoyilkolin (Şekil 1) kullanarak inceledik. Bu etkileşim, kanser tedavisi aracı olarak IAA kullanılması durumunda, hem BChE'nin IAA'yı serumdan temizleyecek çöpçü enzim olarak görev alabilecek olması hem de AChE'nin serotonin duyarlılığına sahip olması açısından önem taşımaktadır (16). Olası yeni bir kanser tedavisi veya kolinesteraz inhibitörü geliştirimi çalışmalarına ışık tutacak IAA ile BChE etkileşimi, bizce incelenmeye değer görülmüştür.

## Gereç ve Yöntemler

### Gereçler

Benzoyilkolin iyodür (BzCh), 3-(*N*-morpholino) propan-sulfonik asit (MOPS) Sigma (USA)'dan ve indol-3-asetik asit (IAA) ise BDH'dan alındı. Diğer tüm kimyasallar da

analitik kullanım için üretilmişlerdir. Spektrofotometrik ölçümlerde Shimadzu UV-visible 1601 spektrofotometresi kullanıldı.

### Saflaştırma Çalışmaları

İnsan serum BChE'si, günü geçmiş plazmadan Sarkarati (17) yöntemine göre elektroforetik olarak tek bant gözlemlenir şekilde yaklaşık 18 000 kez saflaştırıldı. Saflaştırma sırasındaki protein taramaları 280 nm'deki absorpsiyon ölçümü üzerinden, saflaştırma basamaklarında protein tayinleri ise Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı (18). Saf BChE'in protein miktarı ise 280 nm'de saf BChE için saptanan  $\Sigma_{1\text{mg/ml}} = 1.8$  değerinden hesaplandı (19).

### Aktivite Tayini ve İnhibisyon Çalışmaları

BChE aktivitesi substrat olarak benzoyilkolin (BzCh) kullanılarak ölçüldü (20). İlk hızlar 37 °C'de, 50 mM MOPS (pH 7.4), 6.25 ng BChE ve 5-50  $\mu\text{M}$  BzCh içeren aktivite ortamında, 240 nm'deki absorpsiyon düşüşü üzerinden belirlendi. Çalışmalarda kullanılan IAA, % 0.1 etanol içeren 100 mM MOPS pH 7.4 tamponda günlük olarak hazırlandı. IAA'nın inhibitör etkisi 0-4 mM aralığında çalışıldı. Deneysel ortamdan kaynaklanabilecek etkileşimler, salt IAA, enzim içermeyen aktivite karışımı gibi farklı kör karışımları hazırlanarak ortadan kaldırıldı. Her ölçüm en az üç kez tekrarlandı. Bir ünite BChE, yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1  $\mu\text{mol}$  ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarıdır.

### İstatistik İncelemeler

Çalışma verilerinin istatistik incelemeleri ile inhibisyon modellemeleri Systat 11.0 istatistik analiz programının non-linear regresyon modülü kullanılarak gerçekleştirildi.

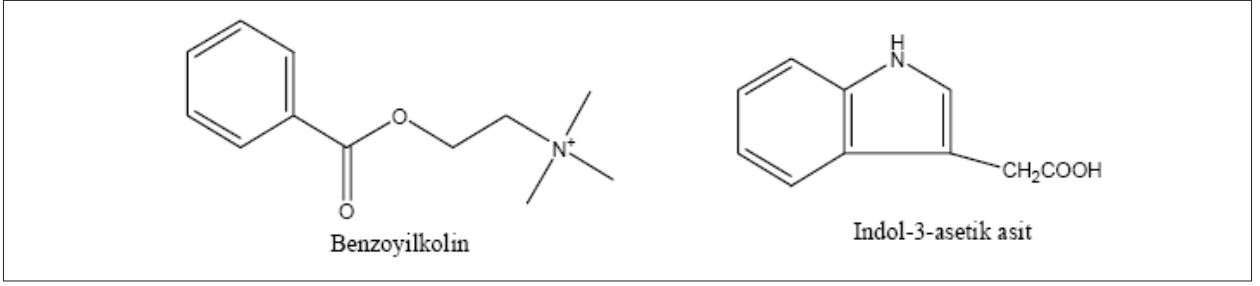
## Sonuçlar

### Substrat Kinetiği

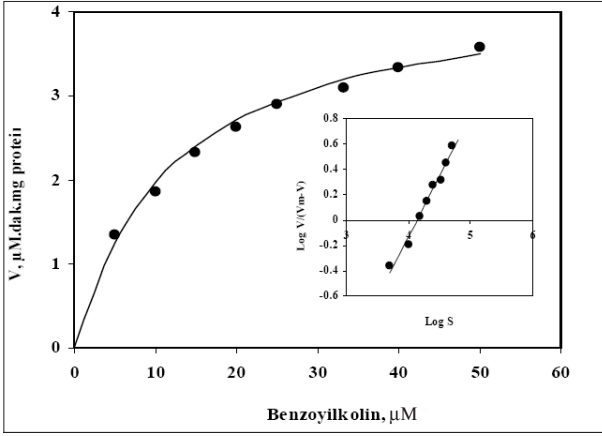
BChE, açil grup taşıyan pozitif yüklü kolin türevi substratları ile Michaelis-Menten kinetiğine uygun davranış sergilememekte, ya substrat aktivasyonu ya da substrat inhibisyonu göstermektedir (1,2). Çalışmamızda aromatik halka taşıyan pozitif yüklü bir substrat olan benzoyilkolin (Şekil 1) ile BChE'nin gösterdiği kinetik davranış incelendi ve veriler Systat 11.0 istatistik analiz programının non-linear regresyon modülü kullanılarak,  $V_m$  değeri  $5.39 \pm 0.82 \mu\text{M/dak/ mg}$  protein ve  $K_m$  değeri ise  $14.22 \pm 2.97 \mu\text{M}$  olarak hesaplandı (Şekil 2).  $V_m$  değeri kullanılarak elde edilen Hill grafiğinden hesaplanan BzCh için Hill sabitinin ( $n_H = 0.95$ ) 0.90 değerinden büyük bulunması, enzimin substrat olarak benzoyilkolin kullanıldığında Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu gösterdi (Şekil 2 İç grafik) (21).

### IAA ile İnhibisyon Çalışmaları

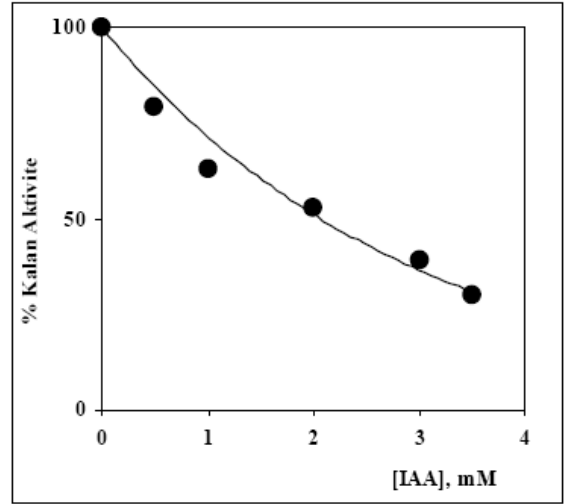
Sabit BzCh (50  $\mu\text{M}$ ) ve artan IAA derişimleri ile yapılan incelemelerde BChE'nin ilk hızları ölçülerek IAA'nın inhibitör etkisi tespit edildi (Şekil 3). IAA, yüksek



Şekil 1. Benzoylkolin ve indol-3-asetik asidin kimyasal yapıları.



Şekil 2. BChE'nin artan BzCh ile gözlenen kinetik davranışı. İç grafik: Hill grafiği, büyük grafik: Michaelis Menten grafiği.



Şekil 3. Artan IAA derişimlerinin sabit BzCh (50 µM) varlığında BChE üzerine etkisi.

derişimlerde suda çözülebilen bir madde değildir. Çalışmamızda IAA'nın çözüldüğü koşulların deney ortamını etkilememesi amacı ile çözücünün olası en düşük etkileşimini yaratacak koşullar sağlandı. Bu nedenle de daha yüksek IAA derişimlerinde ilk hızın sifıra ulaşip ulaşmadığı tespit edilemedi ve gözlenen inhibisyonun tipini belirlemek üzere ileri kinetik çalışmalar yapıldı.

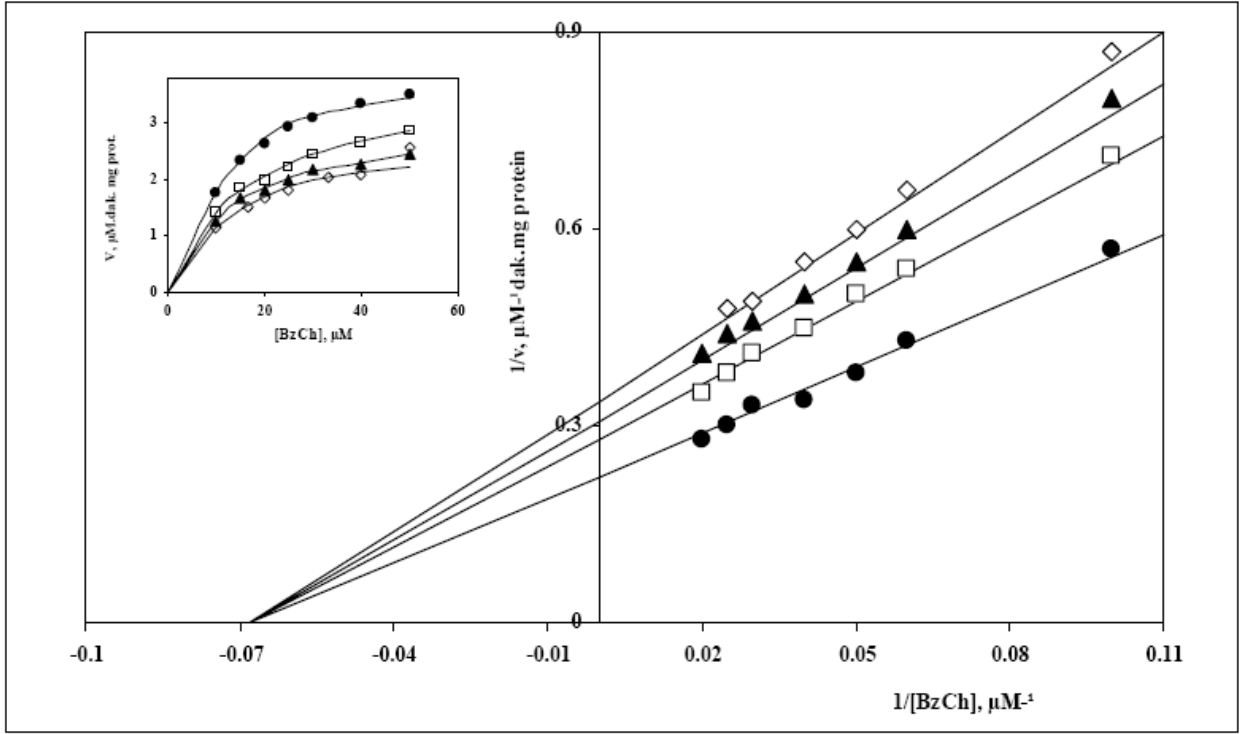
Farklı sabit IAA derişimlerinde artan BzCh derişiminin etkileri ölçülerek inhibisyon tiplmesi yapıldı. Kompetitif inhibisyonda Km değerinde değişiklik olur ve artan inhibitör derişimi ile gözlenen Km artarken Vm değerinde değişim saptanmaz (22). Artan IAA- BzCh etkileşimi Michaelis-Menten grafiklemesi ile incelendiğinde (Şekil 4 iç grafik) Km değerinden daha fazla Vm değerinin etkilendiği gözlemlendi. Elde edilen verilerin Systat 11.0 istatistik programında inhibisyon modellemesi yapıldığında IAA'nın BChE'yi nonkompetitif tipte inhibe ettiği bulundu. Nonkompetitif inhibisyon modeline ait Lineweaver-Burk grafiklemesi (Şekil 4), istatistik incelemeler ile uyumludur. Modelleme sonucunda IAA için Ki değeri  $1.86 \pm 0.27$  mM olarak hesaplandı.

## Tartışma

İnsan serum BChE'si açıl grup taşıyan pozitif yüklü substratı butiriltiyokolin (BTCh) ve aromatik halka taşıyan pozitif yüklü substratı BzCh ile farklı kinetik davranışlar sergiler. Kolinesteraz enzimleri, açıl grup taşıyan substratları ile ya pozitif (AChE) ya da negatif (BChE)

kooperativite gösterirler (23-25). Bu nedenle BTCh için gözlemlenen Hill grafiği yüksek ve düşük substrat derişimlerinde linearityden sapar (21). Bu çalışmada BChE, BzCh ile lineer bir davranış gösterdi. Bu sonuçlar BChE tetramerinde monomerlerin BTCh için farklı afiniteye sahip bağlanma bölgeleri olduğunu, BzCh için ise bağlanma bölgelerinin afinitesinin eşit olduğunu, bu yüzden normal Michaelis-Menten davranışı sergilediğini düşündürmektedir.

BChE'nin her monomeri dibinde aktif merkezin yer aldığı bir çukura sahiptir. Çukurun girişinde pozitif yüklü substratları bağlayan "periferik anyon bağlayıcı bölge" (PAS) mevcuttur. PAS'a yüklü uçundan bağlanan substrat çukurun içine sarkıtılır ve hidrofobik diğer ucu aktif merkeze komşu olan "hidrofobik cep"e bağlanır. Substratın bu pozisyonu ester bağını, bu bağın hidrolizinden sorumlu aktif merkez "katalitik üçlüsü"nü önüne konumlandırır ve hidroliz gerçekleşir (26). BChE aktif merkez çukuru, benzer yapısal özellik gösteren AChE ile kıyaslandığında hem daha büyük hem de hidrofobik amino asitlerce daha zengindir. Bu nedenle açilkolin türevi substratlarda açıl grup büyüdükçe BChE aktif merkezine bağlanma afiniteleri artar (26). Benzoylkolin hidrofobik bir aromatik halkaya sahiptir ve BTCh ile kıyaslandığında enzimin BzCh'ye afinitesi-



Şekil 4. Artan BzCh varlığında farklı IAA derişimlerinin BChE ilk hızına etkileri. (-●-) Kontrol doğrusu, (-□-) 0.5 mM IAA, (-▲-) 0.75 mM IAA, (-◇-) 1 mM IAA. İç grafik: Michaelis- Menten grafiği, büyük grafik: Lineweaver-Burk grafiği.

ni yaklaşık 20 kat daha büyük bulduk. (Örneğin, insan serum BChE'si için BTCh kullandığımızda  $K_m = 0.28$  mM (14), BzCh kullanılan bu çalışmada  $K_m = 14.22$   $\mu$ M olarak hesaplandı.)

Substrat olarak BTCh kullanıldığımız çalışmalarda IAA'yı, BChE'nin lineer karışık tipte inhibitörü olarak tespit ettik (14,15). Substrat olarak BzCh kullanıldığımız bu çalışmamızda ise nonkompetitif inhibisyon saptanmıştır. Karışık lineer tip inhibisyonda inhibitör, nonkompetitif inhibisyonda da olduğu gibi, hem serbest enzime (E) hem de enzim-substrat (ES) kompleksine substrat bağlanma bölgesi dışında bir yerden bağlanabilir (27). IAA'nın indol halkası da hidrofobik büyük bir gruptur ve aktif merkeze komşu "hidrofobik cep" dahil aktif merkez çukurunun diğer hidrofobik amino asitlerine de bağlanabilir. Bu bağlanma BzCh'nin PAS'a bağlanıp çukura sarkıtılmasına ve "katalitik üçlü" karşısına yerleşmesine engel değildir, fakat çukurdaki IAA varlığıyla oluşan konformasyon değişikliği ester bağı hidrolizini engellemektedir.

BTCh kullanıldığında gözlenen lineer karışık tipte inhibisyonda da nonkompetitif inhibisyonda olduğu gibi BTCh hem serbest E hem de EI kompleksine bağlanabilir. Aralarındaki fark EI kompleksinin BTCh'ye olan afinitesinin bir  $\alpha$  katsayısı kadar azalmış olmasıdır (27). İndol grubun bağlandığı bölge, butiril grubun aktif merkeze yerleşiminde sterik bir engel oluşturarak  $K_m$  değerinin büyümesine neden olurken (14), benzoyil grubun aktif merkeze yerleşimine engel teşkil etmemektedir.

Hem asetil- hem de butirikolinesteraz üzerinde saptanan bir başka enzim aktivitesi daha vardır. Arilaçilamidaz (AAA) adı verilen bu aktivitenin serotonin ve melatonin düzeylerine duyarlı olduğu saptanmıştır (16,28). Bu ikincil aktivitenin kolinesterazların gelişim sırasındaki rolleri ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca BChE'nin AAA aktivitesi üzerine tiramin'in uyarıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir (16,28). Biz çalışmalarımızda bitki serotoninini kabul edilen IAA ile BChE'nin inhibisyonunu inceledik. Vücut sıvılarında doğal olarak bulunan (11) ve BChE'nin esteraz aktivitesinin inhibitörü olan IAA'nın, asıl işlevinin AAA aktivitesini düzenlenmek olduğu düşünülebilir.

IAA yeni BChE inhibitörü tasarlanmasında model olarak kullanılabilir. Kompetitif inhibisyon modelinde inhibitör ligandların aktif merkez üzerinde substrat ile aynı bölgeye bağlanması, kolinesteraz gibi yaşamsal önem taşıyan enzimlere yönelik ilaç tasarımında kullanımları açısından sorun yaratabilir. Solunum başta olmak üzere birçok motor sinir iletiminde yer alan kolinesterazların tüm olarak inhibisyonu, ilaç kullanımında istenilen bir durum değildir. BChE üzerinde IAA'nın farklı yük özelliğine sahip substratlar varlığında mekanizma olarak benzeşen ve kompetitif olmayan türde inhibitör etkisi göstermesi bu molekülün ilaç tasarımında model olarak kullanılması olasılığını arttırmaktadır. Bugüne dek IAA ile doğrudan AChE etkileşimini araştıran bir çalışma rapor edilmemiştir. Bu aşamadaki amacımız insan AChE ile IAA etkileşimini incelemek ve kolinesteraz inhibitörleri geliştiriminde IAA'ı ilaç hammaddesi olarak kullanımını daha da irdelemektir.

## Kaynaklar

- [1] Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Valette FM. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 41: 31–91.
- [2] Brown SS, Kallow W, Pilz W, Whittaker M, Woronick CL. (1981) The plasma cholinesterases: A new perspective. *Adv Clin Chem* 22: 1 – 123.
- [3] Rhynäen RJJ. (1983) Pseudocholinesterase activity in some body fluids. *Gen Pharmacol* 14: 459 – 460.
- [4] Ashani Y, Shapiro S, Levy D, Wolfe AD, Doctor BP, Raveh L. (1991) Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice. *Biochem Pharmacol* 41: 37–41.
- [5] Giacobini E. (2000) Cholinesterase inhibitors: From the Calabar bean to Alzheimer therapy. In: *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors* (E. Giacobini, Ed.), pp. 181–226. Martin Dunitz Ltd., London.
- [6] Somani SM, Dube SN. (1989) Physostigmine—an overview as pretreatment drug for organophosphate intoxication. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 27 (8):367-87
- [7] Wallace LMA (1998) Medical Management of Glaucoma. *The New England Journal of Medicine (NEMJ)* 339: 1298-1307.
- [8] Kawaguchi N, Kuwabara S, Nemoto Y, Fukutake T, Satomura Y, Arimura K, Osame M, Hattori T; The Study Group for Myasthenia Gravis in Japan. (2004) Treatment and outcome of myasthenia gravis: retrospective multi-center analysis of 470 Japanese patients, 1999-2000. *J Neurol Sci.* 224 (1-2):43-7.
- [9] Normanly J, and Bartel B, Redundancy as a way of life—IAA metabolism, *Curr Opin Plant Biol* 2, 207 (1999).
- [10] Greco AV, Mingrone G, Favuzzi A, Bertuzzi A, Gandolfi A, DeSmet R, Vanholder R, Gasbarrini G. (2000) Subclinical hepatic encephalopathy: role of tryptophan binding to albumin and the competition with indole-3-acetic acid. *J Investig Med* 48 (4):274-80.
- [11] Anderson GM, Gerner RH, Cohen DJ, Fairbanks L. (1984) Central tryptamine turnover in depression, schizophrenia, and anorexia: measurement of indole acetic acid in cerebrospinal fluid. *Biol Psychiatry* 19 (10):1427-35.
- [12] Antoshechkin AG, Zuyeva LA, Maximova LA. (1988) Excretion of phenylpyruvic, 4-hydroxyphenylpyruvic and indolyl-3-acetic acids by the skin fibroblasts from a phenylketonuric child. *J Inherit Metab Dis.* 11:299-301.
- [13] Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. (1998) Toward targeted “oxidation therapy” of cancer: peroxidase-catalysed cytotoxicity of indole-3-acetic acids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 42 (4):917-20.
- [14] Çokuğraş AN, Bodur E. (2003) Comparative effects of two plant growth regulators; indol-3-acetic acid and chlorogenic acid on human and horse serum butyrylcholinesterase. *Pesticide Biochem Physiol* 77 (1); 24-33.
- [15] Bodur E, Çokuğraş AN. (2005) The effects of Indole-3-acetic acid on human and horse butyrylcholinesterases. *Chem-Biol Interact* 157–158: 375-378.
- [16] Balasubramanian AS, Bhanumathy CD. (1993) Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J* 7: 1354-1358.
- [17] Sarkarati B, Çokuğraş AN, and Tezcan EF. (1999) Inhibition kinetics of human serum butyrylcholinesterase by Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Al<sup>3+</sup>; Comparison of the effects of the metal ions on cholinesterases, *Comp Biochem Phys* 122, 181
- [18] Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- [19] Lockridge O, La Du BN. (1978) Comparison of atypical and usual human serum cholinesterase. Purification, number of active sites, substrate affinity, and turnover number. *J Biol Chem.* 253 (2):361-6.
- [20] Kalow W, Lindsay HA (1955) A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Can J Biochem Physiol* 33: 568- 574.
- [21] Segel IH, “Enzyme Kinetics”, p. 373-375, Wiley, Toronto, 1975.
- [22] Segel IH, “Enzyme Kinetics”, p. 100-160, Wiley, Toronto, 1975.
- [23] Masson P, Adkins S, Gouet P, Lockridge O. (1993) Recombinant human butyrylcholinesterase G390, the fluoride-2 variant, expressed in Chinese hamster ovary cells, is a low affinity variant. *J Biol Chem* 268: 14329– 14341.
- [25] Masson P, Xie W, Froment MT, Lockridge O. (2001) Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the omega loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochem Biophys Acta* 1544: 166-176.
- [26] Yıldız Ö, Bodur E, Çokuğraş AN, Özer N. (2004) Partial purification and characterization of soluble isoform of butyrylcholinesterase from rat intestine. *Protein J* 23: 143-151.
- [27] Çokuğraş AN. (2003) Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem* 28: 54-61.
- [28] Segel IH, “Enzyme Kinetics”, p. 161-226, Wiley, Toronto, 1975.
- [29] Boopathy R and Balasubramanian AS (1985) Chemical modification of the bifunctional human serum pseudocholinesterase. Effect on the pseudocholinesterase and aryl acylamidase activities. *Eur J Biochem* 151: 351-360.