تحديد القيم الطبيعية لإنزيم الريدينيز بالطريقة الطيفية

ذكرى علي علوش ، إسراء عبد الحق الجراح

قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٣١ / ٥ / ٢٠٠٩ ---- **تاريخ القبول:** ٢٧ / ٤ / ٢٠١٠)

الملخص

درست فعالية إنزيم الريدينيز في مكونات الدم (الدم الكلي, البلازما, المصل , متحلل كريات الدم الحمراء) وجد إن أعلى فعالية للإنزيم كانت في متحلل كريات الدم الحمراء لم يكن هناك فرق معنوي عند مستوى الاحتمالية $p < 0.01$ استخدام أنواع من مضادات التخثر (EDTA , الاوكزاليت , الهيبارين) لكن وجد زيادة في فعالية الإنزيم باستخدام أملاح الستريت وتم تحديد الظروف المثلى التي يعمل عليها الإنزيم في البلازما وجد إن أعلى فعالية كانت عند استخدام حجم البلازما(٥٠ مايكرولتر) وزمن التفاعل دقيقة واحدة وبدرجة حرارة(٥٠°م) وبتركيز (١٢٥ ملي مول) من صوديوم ثايوسلفات و (١٢٥ ملي مول) بوتاسيوم سيانيد. كما وجد إن أملاح الكالسيوم والكبريتيت لها فعل تثبيطي أعلى من الفورمالديهايد.

كذلك وجد إن المعدل الطبيعي لفعالية إنزيم الريدينيز بالاعتماد على الظروف المثلى التي تم تحديدها كانت بحدود (٩٨,٥ ± ٤,٥ U/ml) وأظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي في فعالية الإنزيم في البلازما بين الذكور والإناث بينما وجد ارتفاع معنوي في فعالية الإنزيم مع تقدم العمر عند مستوى الاحتمالية $p < 0.01$.

المقدمة

يعد إنزيم الريدينيز (E.C:2.8.1.1) من الأنزيمات واسعة الانتشار في الطبيعة إذ توجد بتراكيز عالية في مايتوكوندريا الكبد وقشرة الكلية وتراكيز واطئة في العضلة الهيكلية الملساء ونخاع العظم والطحال (١) كذلك يوجد إنزيم الريدينيز في كريات الدم الحمراء (٢) وفي مصل و بلازما الدم (٣، ٤).

يوجد الانزيم بشكلين المفسفر وغير المفسفر وهذان شكلان متماثلان فيما يتعلق بالمتغيرات الحركية, تركيب الأحماض الامينية ومحتوى مجموعة الثايول SH(٥). ومن أهم وظائف إنزيم الريدينيز هي إزالة سمية السيانيد الذي يكون عادة في الكبد(٦,٧). إذ تتكون جزيئه إنزيم الريدينيز المنقى في الكبد ألبقري من سلسلة منفردة متعددة الببتيد مكونة من (٢٩٣) حامض أميني(٨) وان الموقع الفعال في الإنزيم يمثل مجموعة الثايول SH المهمة في تحفيز الإنزيم حيث تمثل هذه المجموعة موقع ارتباط الإنزيم مع مادة الأساس في معقد الإنزيم – المادة الأساس (٩) .

يعد إنزيم الريدينيز من الأنزيمات الناقلة إذ يحفز انتقال ذرة الكبريت من المادة الواهبة للكبريت (ثايوسلفات) إلى مستقبل نيوكليوفيلي هو سيانيد مؤديا إلى تكوين الثايوسيانيد وايون الكبريت الذي يطرح عن طريق الإدرار(١١,١٠)وكما موضح في المعادلة أدناه.

الإدرار(١١,١٠)وكما موضح في المعادلة أدناه.

$$CN^- + S_2O_3^{-} \xrightarrow{\text{Rhodanese}} N^- + SO_3^-$$

وتشير معظم الدراسات إلى استخدام التفاعل التحفيزي السابق للإنزيم في تقدير فعالية إنزيم الريدينيز الناتجة من التفاعل وتكوينها معقدا مع كاشف نترات الحديديك الذي يقاس طبيعيا عند طول موجي (٤٦٠ نانوميتر) (١٣,١٢) .

كذلك توجد طريقة أخرى لتقدير فعالية إنزيم الريدينيز باستخدام جهاز pH-stat بقطب حساس للسيانيد(١٤) كذلك طورت طريقة بسيطة للتقدير السريع الدقيق لإنزيم الريدينيز باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية (١٥).

الهدف من البحث

يهدف البحث إلى إيجاد فعالية إنزيم الريدينيز في مكونات الدم (البلازما, المصل , متحلل كريات الدم الحمراء , الدم الكلي)ومن ثم تحديد الظروف المثلى الذي يعمل عليها الإنزيم في احدى مكونات الدم فضلا عن تحديد القيم الطبيعية للإنزيم بالاعتماد على الطريقة المحورة وذلك لعدم وجود دراسة سابقة حول الانزيم والقيم الطبيعية له في العراق ماعدا دراسة عن عزل الانزيم وبيان دوره بازالة سمية السيانيد(١٦) .

المواد وطرق العمل

جمع النماذج

١. مصل الدم :

جمعت عينات الدم من متبرعين اصحاء ظاهريا ووضعت في حمام مائي بدرجة ٣٧ مْ ولمدة ١٥ دقيقة , بعدها تم فصل الجزء المتخثر من المحلول الرائق باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة(٤٠٠٠ g) ولمدة ١٠ دقائق فالمحلول الرائق يمثل مصل الدم(١٧) .

٢ . بلازما الدم :

تم سحب الدم من وريد الذراع وُضِعَ في أنبوبة اختبار حاوية على احدى مواد مانعة للتخثر وهي الهيبارين ، الاوكزالات ، الستريت و رباعي حامض الخليك اثيلين ثنائي امين(لغرض بيان تاثيرها على الفعالية) ثم تم فصل البلازما (١٧) .

٣. متحلل كريات الدم الحمر :

لفصل كريات الدم الحمراء عن بقية مكونات الدم يجب الحصول أولاً على دم غير متخثر بوضع الدم المسحوب في أنبوبة حاوية على مادة مانعة للتخثر (EDTA) ثم فصل كريات الدم الحمراء بطريقة النبذ المتكرر وباستخدام محلول(٠,٩%) كلوريد الصوديوم وبعد ان

أصبحت جاهزة للتحلل تم تحضير متحلل كريات الدم الحمراء بأخذ حجم واحد من كريات الدم الحمراء المحضرة وأضيف إليها ١٩ حجم من(٠,٠٩%) كلوريد الصوديوم ومزج جيدا ووضع في الحاضنة المبردة بدرجة(٤°C) لمدة (٤) ساعات ثم وُضع في جهاز الطرد المركزي لغرض ترسيب أغشية كريات الدم الحمر بعدها اخذ الراشح(١٨) واهمل الراسب.

– تقدير فعالية إنزيم الريدينيز :

قدرت فعالية إنزيم الريدينيز بالاعتماد على تكوين معقد الثايوسيانيت (١٩) إذ يعمل الانزيم على نقل ذرة الكبريت من المادة الواهبة لكبريت (ثايوسلفات) الى مستقبل نيكلوفيلي (سيانيد)كما في المعادلة التالية

$$CN^- + S_2O_3^- \xrightarrow{\text{Rhodanese}} SCN^- + SO_3^-$$

يتكون معقد الثايوسيانيت في درجة حرارة ٣٠م وبزمن ٣٠ دقيقة بعدها يضاف الفورماليديهايد لتثبيط التفاعل ويتكون المعقد الملون بعد اضافة نترات الحديديك الذي يقاس له الامتصاصية عند ٤٦٠ نانوميتر أن الوحدة الإنزيمية U: هي كمية الإنزيم التي تعمل على تكوين مايكرومول من المادة الناتجة (Thiocyanate) في الدقيقة الواحدة في مللتر واحد .

دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم الريدينيز :

دراس تأثير بعض العوامل على فعالية الإنزيم لغرض تحديد الظروف المثلى لعمل الإنزيم وهي:

١. حجم المصل .
٢. زمن التفاعل .
٣. درجة حرارة التفاعل .
٤. تركيز مادة الأساس .
٥. مثبطات التفاعل لإيقافه .

تحديد المعدل الطبيعي لإنزيم الريدينيز :

تم جمع (٦٠) نموذج لأشخاص أصحاء ظاهريا متبرعين من طلبة وتدريسين جامعة الموصل للفترة (ايلول ٢٠٠٨ الى كانون الثاني ٢٠٠٩) بعدد (٣٢) إناث و(٢٨) ذكور تراوحت أعمارهم بين (٢٠-٧٠) سنة تم تقدير فعالية إنزيم الريدينيز بالاعتماد على الطريقة المحورة بعد تثبيت الظروف المثلى لعمل الانزيم . ثم دراسة تأثير العمر , الجنس على فعالية إنزيم الريدينيز في الأشخاص الأصحاء .

النتائج والمناقشة :

تقدير فعالية إنزيم الريدينيز في مكونات الدم :

قدرات فعالية إنزيم الريدينيز في مكونات الدم (البلازما , المصل , متحلل كريات الدم الحمراء, الدم الكلي) (١٩) ويبين الجدول (١) وجود فعالية إنزيم الريدينيز في جميع مكونات الدم وهذا يتفق مع ماوجده كل من (٤,٣,٢) كما يمكن ملاحظة إن فعالية إنزيم الريدينيز في متحلل كريات الدم الحمراء أعلى من مكونات الدم الأخرى ولكن بدون فارق معنوي$p<0.01$ وعليه تم استخدام بلازما الدم في التجارب اللاحقة وذلك لسهولة الحصول عليه وعدم وجود فرق معنوي في فعالية الانزيم بين المكونات الاخرى.

جدول (١) فعالية إنزيم الريدينيز في مكونات الدم المختلفة

Sample	Activity U/ml Mean ± S.E
plasma	٠,٦٨١ ± ٠,١١٦
serum	٠,٦٧٥ ± ٠,٠٩٢
hemolysis RBC	٠,٧٧٠ ± ٠,٠١٤
whole blood	٠,٦٨ ± ٠,٠٢

تقدير فعالية إنزيم الريدينيز باستخدام أنواع من مضادات التخثر:

قدرت فعالية إنزيم الريدينيز في البلازما والدم باستخدام أنواع من مضادات التخثر (EDTA , الستريت , الاوكزاليت , الهيبارين) وبالاعتماد على طريقة (١٨) ويلاحظ من النتائج في الجدول (٢) عدم وجود فرق معنوي $p < 0.01$ عند استخدام مضادات التخثر ماعدا وجود زيادة في فعالية الإنزيم باستخدام أملاح الستريت مقارنة بمضادات التخثر الأخرى وربما يرجع السبب إلى إن أملاح الستريت تعمل على تنشيط الإنزيم .

جدول (٢) فعالية إنزيم الريدينيز باستخدام أنواع من مضادات التخثر

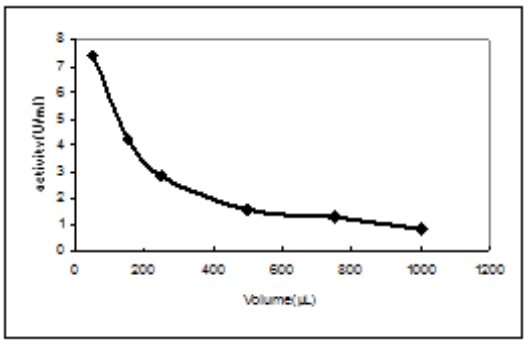
n	Anticoagulant	Activity in ♂ plasma U*/ml Mean ± S.E	Activity in serum U*/ml Mean ± S.E
.١	EDTA	٠,٦٨٠± ٠,٠١٢	٠,٦٨ ± ٠,٠١٢
.٢	Sod. Citrate	٠,٩٣٠* ± ٠,٠١٣	± ٠,٠١٨ ٠,٩٥*
.٣	Ca- Oxalate	٠,٦٢٥ ± ٠,٠١٦	٠,٦٣ ± ٠,٠١٤
.٤	Heparin	٠,٦٨ ± ٠,٠١٤	٠,٦٧ ± ٠,٠١١

* Sig . at $p < 0.01$

دراسة الظروف المثلى على فعالية انزيم الريدينيز :

١. تأثير حجم بلازما الدم :

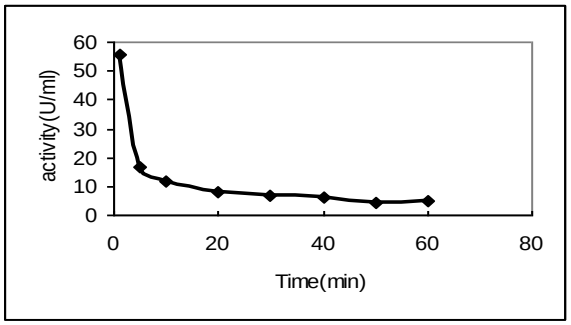
تم قياس الفعالية الانزيمية باستعمال أحجام متدرجة من بلازما الدم تراوحت بين (50-1000 µl) يبين شكل (١) إن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند استخدام حجم (50 µl) وعليه استخدم حجم (50 µl) في جميع التجارب اللاحقة .



شكل (١) تأثير حجم بلازما الدم على فعالية إنزيم الريدينيز .

٢ .تأثير زمن التفاعل :

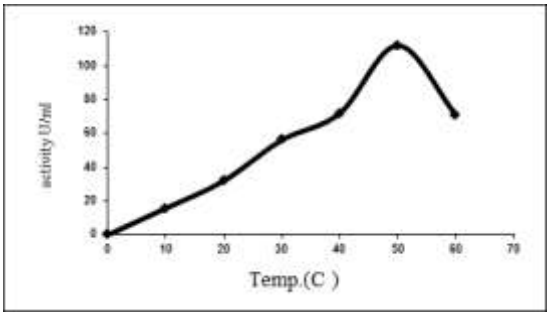
دراس تاثير زمن التفاعل على الفعالية الانزيمية لاختيار الفترة الزمنية المثالية واللازمة لإتمام التفاعل بمدة زمنية (١-٦٠)دقيقة ويوضح شكل (٢) إن أعلى فعالية لإنزيم الريدينيز في بلازما الدم كانت عند الدقيقة الأولى من زمن التفاعل ولذلك تم تثبيت زمن التفاعل دقيقة واحد اذ كان زمن التفاعل حسب (١٩)هو ٣٠دقيقة .



شكل (٢) تأثير زمن التفاعل على فعالية إنزيم الريدينيز في بلازما الدم

٣. تأثير درجة الحرارة :

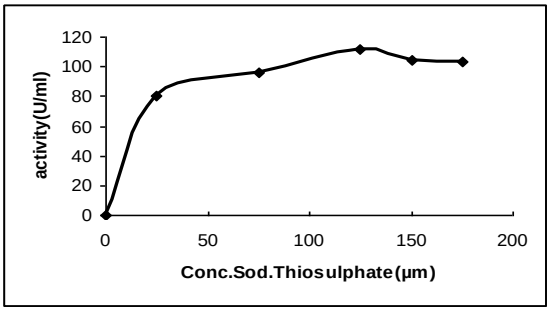
قدرت فعالية إنزيم الريدينيز في درجات حرارية مختلفة (٠-٦٠)م ويلاحظ من شكل (٣) ان الارتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يعمل على رفع فعالية الإنزيم تدريجيا حتى تصل درجة الحرارة إلى(٥٠مْ) ثم يحصل بعد ذلك انخفاض واضح في فعالية الإنزيم عند درجات الحرارة الأعلى من ذلك وهذا يتفق مع ما وجد(٢٠) .



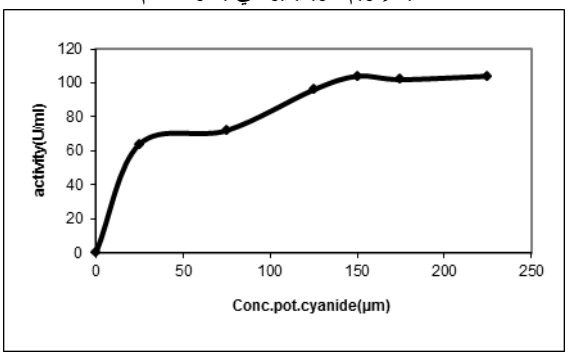
شكل (٣) تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية إنزيم الريدينيز في بلازما الدم

٤. تأثير تركيز المادة الأساس :

لدراسة العلاقة بين فعالية إنزيم الريدينيز وتركيز مادة الأساس ثايوسلفات الصوديوم وسيانيد البوتاسيوم تم قياس فعالية إنزيم الريدينيز بوجود تراكيز مختلفة لكلتا المادتين تتراوح بين (مايكرومول٢٢٥-٢٥) ويلاحظ من شكل ٤ إن زيادة ثايوسلفات الصوديوم يعمل على زيادة سرعة التفاعل وبذلك يمكن تحديد تركيز مادة الاساس اللازمة للحصول على السرعة القصوى وهي (مايكرومول ١٢٥) وهذا يتفق مع(٢٠) كذلك يظهر شكل (٥) إن زيادة تركيز مادة الأساس سيانيد البوتاسيوم يعمل على زيادة سرعة التفاعل حتى تصل إلى قيمة لا يحدث بعدها زيادة في سرعة التفاعل وبذلك يمكن تحديد تركيز مادة الأساس اللازمة للحصول على السرعة القصوى وهي (مايكرومول ١٥٠) وهذا يتفق مع(١٦) .



شكل (٤) تأثير تركيز مادة الأساس ثايو سلفات الصوديوم على فعالية إنزيم الريدينيز في بلازما الدم .



شكل (٥) تأثير تركيز مادة الأساس سيانيد البوتاسيوم على فعالية إنزيم الريدينيز في بلازما الدم .

١. تأثير نوع المثبط :

قدرت فعالية إنزيم الريدينيز باستبدال الفورمالديهايد الذي يعمل على ايقاف التفاعل التحفيزي بواسطة الانزيم بأنواع مختلفة من المثبطات الموضحة في الجدول (٣) ويلاحظ من النتائج إن أملاح الكالسيوم و الكبريتيت لها فعل تثبيطي أعلى من الفورمالديهايد على فعالية إنزيم الريدينيز في بلازما الدم وربما يعود السبب الى التاثير الايوني للاملاح على الفعالية وترسيب الانزيم.

جدول (٣) تأثير أنواع من المثبطات على فعالية إنزيم الريدينيز في بلازما الدم .

*% Inhibition	Activity U/ml Mean ± S.E	Inhibitors
٠	١٠٤±2.1	formaldehyde

Na_2SO_3	٨٨±1.1	١٥,٣
$CaCl_2$	٨٠±1.5	٢٣,٠
$BaCl_2$	٨٨±1.3	١٥,٣
$MgSO_4$	٩٦±1.5	٧,٦

* تم حساب نسبة التثبيط بالاعتماد على الفعالية باستخدام الفورمالديهايد حسب طريقة(١٩).

الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم الريدينيز :

تم مقارنة فعالية إنزيم الريدينيز المقاس في بلازما الدم باستخدام طريقة (١٩) والطريقة المحورة التي تم تثبيت الظروف المثلى لها ، اذ تم تغيير حجم المصل من ١٠٠٠ الى ٥٠ مايكروليتر وزمن التفاعل من ٣٠ دقيقة الى دقيقة واحدة ودرجة حرارة التفاعل من ٣٠ الى ٥٠ درجة مئوية وتركيز مادة الأساس سيانيد البوتاسيوم من ١٢٥ الى ١٥٠ مايكرومول وعليه وجد إن فعالية إنزيم الريدينيز في الطريقة المحورة أعلى من طريقة (١٩) كما موضح في الجدول (٤) وذلك بسبب استخدام حجم اقل وزمن اقصر عند قياس الفعالية .

جدول (٤) الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم الريدينيز .

Activity U/ml	Conc. Of substrate		Temp. °C	Time min	Serum volume	Types of methods
	KCN	Na_2SO_3				
٠,٧٨±٠,١	١٢٥	١٢٥	٣٠	٣٠	١ ml	Using procedure (١٩)
١٠٤±٤,٥	١٥٠	١٢٥	٥٠	١	٥٠µ l	Using development method

المعدل الطبيعي لإنزيم الريدينيز في بلازما الدم :

تم إيجاد المعدل الطبيعي لإنزيم الريدينيز في بلازما الدم باستخدام الطريقة المحورة وبينت النتائج في الجدول (٥) إن المعدل الطبيعي لإنزيم الريدينيز كان بحدود (٩٨,٥±٤,٥) وهو أعلى ما وجده(٢١) وذلك بسبب اختلاف طريقة قياس الفعالية اذ اعتمد على الظروف المثلى التي تم ايجادها بالطريقة المحورة عند قياس فعالية انزيم الريدينيز في بلازما الدم.

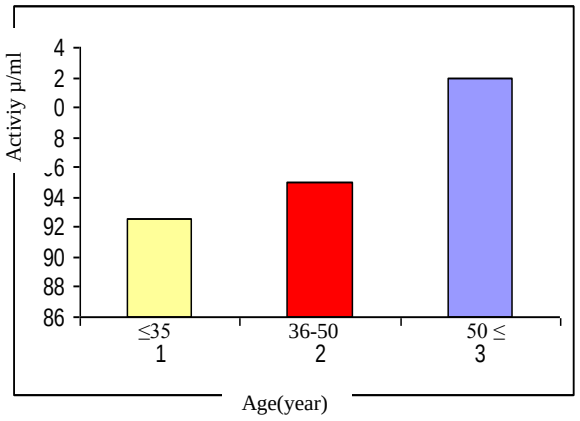
كما تم دراسة تأثير الجنس على فعالية إنزيم الريدينيز في بلازما الدم وقد أظهرت النتائج في الجدول (٥) عدم وجود فرق معنوي في فعالية الإنزيم بين الذكور والإناث وهذا يتفق مع دراسات سابقة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين الذكور والإناث (٢١،٢٢) في الفعالية الانزيمية وذلك بسبب عدم وجود علاقة بين انزيم الريدينيز والهرمونات الجنسية.

جدول (٥) المعدل الطبيعي لإنزيم الريدينيز في بلازما الدم

Male	Female	Total	Activity U/ ml
٩٧±١,٥	١٠١±٢٥	٩٨,٥±٤,٥	

تأثير العمر على فعالية إنزيم الريدينيز :

قسمت نماذج الدراسة إلى فئات عمرية (٣٥≥ , (٣٦-٥٠) , ٥٠≤) وتمت دراسة تأثير العمر على فعالية إنزيم الريدينيز وأظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي في فعالية إنزيم الريدينيز مع تقدم العمر كما مبين في شكل (٦) وهذا يتفق مع ما بينه(٢١،٢٢) بسبب زيادة عمليات البناء مما يتطلب زيادة عنصر الكبريت الذي يدخل في بناء البروتينات .



شكل (٦) تاثير العمر على فعالية انزيم الريدينيز في بلازما الدم

REFERECES

1- Sylvester, M and Sander,C.(1990). "Immunohistochemical localization of rhodanese" Histochem. J.22(4): 197-200 .

2- Leurg, P; Davis, R; Cannon, E.P. and Way, J.(1991). "Rhodanes and sodium thiosulphat encapsulated in mouse carrier erythrocytes "Toxicol. Sci. 16(3) .559- 566 .

3- Narendranathan,M; Shrama, K.N and Sosamma, P.I.(1989). "Serum rhodanese in goiter and calcfic pancreatitir of tropics". J.Asso. phys. Ind.37(10):648-649 .

4- Drawbaugh, R.B and Marrs, T.J,(1987). "Interspecies differences in rhodanese activity, Kidney and plasma "comp. Biochem. physiol. 86.307-310 .

5- Blumenthal, K.M and Heinrikson, R.L.(1971). "Structural studies of bovine liver rhodanese:1.isolation and characterization of two active forus of the enzymes " J.Biol.chem.246(8):2430-2437 .

6- Aminlari, M and Gilanpour H (1991). " Comparative studies on the distribution of rhodanese in different tissues of domestic animals" .

7- White House, D.B.,Pilz, A.J.and Porta, G(1988). " Rhodanes isozymes in human tissues" Ann.Hum Genel. 52:1-10 .

8- Kohanki, R.A and Heinrikson, R.L.(1990). "Primary structure of avian hepatic rhodanese J.protein . chem. 9(4): 369-378 .

9- Koloczek, H and Vanderkoo, J.M (1987). "Domain structural flexibility in rhodanese examined by quenching of phosphorescent probe " Biochem. Biophs. Acta.916(2):236-244 .
10- Buzaleh, A.M;Vazqvez, E.S and Battle, A.M.(1990). "The effect of cyanide in toxication on hepatic rhodanese kinetics " Gen-Pharmacol.21(2):219-222.
11- Agboola, F.K and Okoji, R.E.(2004) ."Presence of rhodanese in the Cytosolic fraction of the fruit bat (Eidolon helvum) liver. J. Biochem. Mol. Biol. 37 (3):275-281 .
12- Markku, L; Juhani, V and Jari, H (1999). "Spectrophotometric determination of thiocyanate in human saliva ".J.chem-Edue.76 (9):1281-1282 .
13- Baskin, S and Kirby, L.(1990).The effect of sodium tetra thionate on cyanide conversion to thio cyanat by enzymatic and non- enzymatic mechanism. J.Appl.Toxicol.10(5):379-382 .
14- Cannella, C; Bernaardo, P. and Pecci, L.(1975). "Determination of rhodanese activity using pH-STAT apparatus" . Anal.Biochem.68(2):458-464 .
15- Guilbaul, G.G; Knan, S.S.and Cochran, R.(1971). "Procedure for rapid and sensitive detection of rhodanese separated by poly acrylamide gel electrophoresis ".Anal. Biochem.43(1) : 42-47
16- allwsh,Th. and Kado, Z. (2009). "Biochemical Study of Rhodanese Enzyme Isolating from Blood and its Role in Cyanide Detoxification". Rafidain Sc. J., vol. 20:1, 61-80
17- Bacchus, R; Kilshaw, B.H; Madkour,M;Al-Bassamy M.S and Al-Farhan, C.B.(1980). "Preliminary students in areterence rang for Saudi Arabian males(1) serum uric acid " Saudi med.J.1(13) : 160-162 .
18- Price, N.C and Stevens, L.(1989). "Fundamental of enzymology, 2nd Oxford University press.
19- Urbanska, A;Lezezynsk, B;Matok, H and Dixon, A.(2002). "Cyanide detoxification enzymes of bird cherryoat aphid " Electronic.J.5(2):334-337.
20- Sorbo, B.H.(1953). "Rhodanes" Acta. chem. scand. 7:1132 .
21- Aminlari, M; Gholami S; Naseghi, T; Azadi A; Karimi H.(2000) "Distribution of rhodanese in different parts of the urogenital system of sheep at pre- and post – natural stages".Biochem. physiol-Biochem Mol Biol;127(3):369-74.
22. Allwsh, T.A; Hamodi, I.A; Fakhri A.M.(200٨). "Biochemical study of rhodanes enzyme activity and the relation with some Biochemical parameters in cancer patients". Education &Science vol. 21: 1, 195-212.

Limited Normal Range Of Rhodanese Enzyme by Spectrophotometric method

Thikra A.Allwsh, Israa A.Aljarah
Department of Chemistry, College of Science, Mosul University
(**Received:** 31 / 5 / 2009 ---- **Accepted:** 27 / 4 / 2010)

Abstract
Rhodanese enzyme activity in (whole blood, plasma, serum, hemolysis red blood cell) was studied and shown higher enzyme activity in hemolysis Red Blood Cell and found no significant difference in rhodanese activity in different kinds of anticoagulant (EDTA, Oxalate, Heparin) while there was increase rhodanese activity when using citrate salts at $p < 0.01$.
Maximum enzyme activity was obtained using (50 µl) of plasma in one minute when incubated at (50˚C) using (125 µmol) of sodium thiosulphate and (150 µmol) potassium cyanide as a substrate. There was high inhibition rate by using calcium and sulphite salts compared to formaldehyde .
It has been found that the normal range of Rhodanese activity in plasma according to optimum condition was (98.5±4.5 U/ml) and there was no significant difference in rhodanese activity in sex different while there was a significant increase in enzyme activity related to age at $p < 0.01$.