

ارزیابی فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز در گلبولهای سفید بیماران مبتلا به بیماری انسداد مزمن ریوی (COPD)

محمدسعید هخامنشی^۱، سیدعلیرضا مصباح نمین^{۲*}، مسعود هوشمند^۳، عباس صاحبقدم لطفی^۴

۱- دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ۲- دانشیار گروه بیوشیمی بالینی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ۳- دانشیار گروه ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ۴- استاد گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

سابقه و هدف: بیماری انسداد مزمن ریوی (COPD) یک بیماری ریوی است که با کاهش سرعت خروج هوای بازدمی، افزایش مقاومت سیستم تنفسی و پربادی آن مشخص می شود. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده که فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز تحت تاثیر مقدار اکسیژن ملکولی می باشد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز در گلبولهای سفید بیماران مبتلا به COPD می باشد.

مواد و روشها: مطالعه به صورت مورد-شاهدی بر روی ۴۲ بیمار با شرایط تثبیت شده بالینی و ۵۰ فرد سالم با خصوصیات سنی مشابه بیماران انجام شد. گلبولهای سفید از خون جدا و سپس لیز شدند. پس از سانتریفوژ نمودن آن محلول رویی از نظر مقدار پروتئین و فعالیت آنزیمی سیتوکروم اکسیداز و سترات سنتتاز ارزیابی و فعالیت ویژه مطلق و نسبی بررسی شد.

یافته ها: فعالیت و فعالیت ویژه (مطلق و نسبی) در حدود ۳/۵ برابر و به طور معنی داری در گلبولهای سفید بیماران افزایش یافته بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز افزایش یافته است اما اینکه این تغییر یک پاسخ اولیه یا ثانویه به شرایط هیپوکسی در این بیماران است نیازمند مطالعه بیشتر است.

واژه های کلیدی: بیماری انسداد مزمن ریوی، سیتوکروم اکسیداز، میتوکندری، فعالیت ویژه.

دریافت: ۸۶/۶/۲۶، ارسال جهت اصلاح: ۸۶/۶/۳۰، پذیرش: ۸۶/۸/۲

مقدمه

بیماری مزمن انسدادی ریه یک بیماری شایع است که مشخصه آن انسداد مزمن راه های هوایی شش ها به صورت برگشت ناپذیر می باشد. پیش بینی می شود که تا سال ۲۰۲۰ به مهمترین عامل مرگ و میر تبدیل گردد (۱،۲). طبقه بندی این بیماری بر اساس یک سری پارامترهای فیزیولوژیک است که توسط تست اسپیرومتری مثل حداکثر حجم هوای بازدمی در یک ثانیه ابتدائی بازدِم (Forced Expiratory Volume in First second, FEV1) حاصل می شود (۳،۴). یکی از مهمترین مشکلات این بیماران نارسایی جذب و مصرف اکسیژن است (۵). بخش عمده اکسیژن جذب شده توسط سیتوکروم اکسیداز (COX) مصرف می شود. COX آخرین آنزیم زنجیره تنفسی میتوکندری است و

وظیفه انتقال الکترون از سیتوکروم احیا شده به اکسیژن را به عهده دارد (۶). COX خود، یک کمپلکس پروتئینی در غشاء داخلی میتوکندری است که وزن آن ۲۰۰ KD است. این کمپلکس از ۱۳ زیر واحد پروتئینی تشکیل شده که ۱۰ عدد آن توسط ژنوم هسته و ۳ عدد باقیمانده توسط ژنوم میتوکندری کد می شود (۷). زیر واحد های کد شده توسط ژنوم میتوکندری نقش اساسی را در فعالیت آنزیمی COX به عهده دارند. مطالعات اخیر نشان داده که هیپوکسی نقش مهمی در تغییر میزان بیان ژنهای هسته ای دارد (۸،۹). اما تا کنون مطالعه ای در رابطه با این اثر بر روی ژنوم میتوکندری به ویژه در رابطه با آنزیم COX در گلبول های سفید بیماران مبتلا به COPD انجام نگرفته است. ولی در یک مطالعه فعالیت این آنزیم در

برای آماده سازی نمونه ها تمامی افراد گروه بیمار ۸ ساعت قبل از نمونه گیری هیچ دارویی دریافت نکردند. از هر دو گروه مطالعه ۱۰-۱۲ میلی لیتر خون سیتراته گرفته شد و سپس گلبولهای سفید توسط فایکول (شرکت بیوژن) و دستور العمل مربوطه جداسازی شدند. سپس ۳ بار توسط بافر فسفات مورد شستشو قرار گرفتند. پس از جمع آوری نهایی سلول ها به کمک سانتریفوژ در ۱۵۰g، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH= 7.0, containing 250mM sucrose and 1mM n-dodecyl-β-D-maltoside) به آنها افزوده شد و در ادامه توسط میکروتیوب هموژنایزر (Medi-Cal, cat.#6211) برای ۵ بار و هر بار ۵ ثانیه لیز شدند. n-dodecyl-β-D-maltoside یک دترجنت غیر یونی است که می تواند آنزیم COX را با حفظ قابلیت عملکردی از غشاء داخلی میتوکندری بیرون کشیده و بصورت محلول در آورد (۱۵). هموژن حاصل بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۰۰g سانتریفوژ شده و محلول روئی بعنوان شیر سلولی در ادامه کار مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت COX و سیترات سنتتاز: ابتدا مقدار پروتئین در شیر سلولی به روش برادفورد اندازه گیری شد (۱۶). در ادامه فعالیت آنزیمی COX و سیترات سنتتاز توسط کیت های سنجش فعالیت (Sigma cat# CYTOCOX1 and Sigma cat# CS0720) طبق دستورالعمل مربوطه و توسط اسپکتروفوتومتر دو چشمه ای (Shimadzu, Nagoya, Japan) سنجیده شد. فعالیت ویژه دو آنزیم فوق در تمامی نمونه ها برای مقادیر پروتئین مرتبط تعیین شد. به طور خلاصه برای سنجش فعالیت COX، ۱۰ میکرولیتر از شیر سلولی را با ۹۹۰ میکرولیتر از بافر واکنش مخلوط کرده و سپس برای شروع واکنش ۱۰ میکرولیتر از محلول سیتوکروم C که توسط دی تیو تریتول (DTT) احیاء شده را، به محلول واکنش اضافه کرده و سپس تغییرات جذب نوری را پس از یک تاخیر ۲۰ ثانیه ای، به مدت ۱ دقیقه در طول موج ۵۵۰ نانومتر ثبت می کنیم (ΔA/min). سپس با استفاده از فرمول زیر فعالیت آنزیمی را محاسبه می نمائیم. واحد فعالیت آنزیمی که توسط این کیت محاسبه می شود عبارتست از نانومول بر دقیقه. در این فرمول dil برابر است با ضریب رقت و ۲۱/۸۴ برابر است با ضریب خاموشی در طول ۱ سانتیمتر عرض کووت.

عضله اسکلتی بیماران بررسی شده که نتایج آن حاکی از افزایش فعالیت می باشد (۱۰). از سوی دیگر نتایج یک مطالعه دیگر، کاهش فعالیت این آنزیم را در گلبول های سفید تک هسته ای افراد سیگاری نشان داده است (۱۱). مطالعات دیگر در زمینه نارساییهای تنفسی مربوط به کمبود فعالیت ملکول های دیگر زنجیره تنفسی است (۱۲). لازم به ذکر است که مهمترین ریسک فاکتور COPD استعمال دخانیات است. لذا هدف از این مطالعه سنجش میزان فعالیت آنزیم COX در خون بیماران مبتلا به COPD می باشد.

مواد و روشها

مطالعه به صورت مورد-شاهدی در سال ۱۳۸۵ در بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام گرفت. ۴۲ نفر بیمار (۳۶ مرد و ۶ زن با سن ۶۰±۴ سال) که همگی حداقل یک دوره حاد بیماری را در طی چهار ماه گذشته پشت سر گذاشته بودند و به هنگام نمونه گیری در شرایط تثبیت شده به سر می بردند، به عنوان گروه مورد انتخاب شدند. ۵۰ نفر به عنوان گروه شاهد (۴۲ مرد و ۸ زن با سن ۵۶±۴ سال) که بیمار نبوده و از هیچ دارویی استفاده نمی کردند، انتخاب شدند. بقیه شرایط شبیه گروه مورد بود. تمامی افراد فوق رضایت نامه حاوی اطلاعات و ماهیت تحقیق را مطالعه و امضاء نمودند. جهت بررسی عملکرد ریه تست بررسی عملکرد سیستم تنفسی (Pulmonary Function Test, PFT) در تمامی نمونه ها انجام گرفت. چندین پارامتر برای ارزیابی عملکرد ریه و طبقه بندی COPD وجود دارد که مهمترین آنها یعنی حداکثر حجم بازدمی در یک ثانیه اول (FEV1) و حجم کل بازدمی (Forced Vital Capacity, FVC) در تمامی نمونه ها سنجیده شد (۱۳). مقادیر رفرنس این پارامترها بر اساس جمعیت های مدیرانه ای ارزیابی گشت (۱۴). رتبه بندی بیماری در این سیستم به شرح زیر بود:

- 1. Normal:** (FEV1>75%, Predicted FVC% >75%, FEV1/FVC > 70%)
- 2. Mild COPD:** (FEV1/FVC<70%, Predicted FEV1≥ 80%)
- 3. Moderate COPD:** (FEV1/FVC < 70%, 50% ≤ Predicted FEV1 < 80%)
- 4. Severe COPD:** (FEV1/FVC < 70%, 30% ≤ Predicted FEV1 < 50%)

عملکرد یک آنزیم در بین گروه های مورد بررسی بسیار کارآمد بوده و از قابلیت اعتماد بسیار بالاتری برخوردار است (۱۸).

اطلاعات حاصل از سنجش فعالیت ویژه و نسبی در هر دو گروه بیمار و نرمال با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری t تجزیه و تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته ها

تمامی بیماران نارسائی شدید تنفسی داشتند و محتوی پروتئینی در شیر سلولی تمامی نمونه ها تقریباً نزدیک هم بود (۶ mg/ml \approx شیره سلولی). فعالیت ویژه COX در گروه بیمار (۷۹ \pm ۴) خیلی بیشتر از گروه نرمال (۲۲ \pm ۲) بود. فعالیت ویژه سیترات سنتتاز در هر دو گروه حدوداً ۸۰ بود این اختلاف معنی دار نبود. نسبت این دو پارامتر به عنوان فعالیت نسبی که قابل اعتماد تر است نیز در گروه بیمار بطور معنی داری بیشتر از گروه نرمال بود (جدول ۱). در حقیقت فعالیت نسبی آنزیم COX در گروه بیمار ۳/۵ برابر بیشتر از گروه نرمال بود و الگوی افزایش آن تقریباً شبیه به الگوی افزایش فعالیت مطلق COX بود.

$$Unit/ml = \frac{\Delta A / \min \times dil \times 1.01}{(vol. of enzyme) \times 21.84}$$

پس از تعیین فعالیت آنزیمی، آنرا بر مقدار پروتئین (mg/ml) متناظر همان نمونه تقسیم کرده تا فعالیت ویژه به دست آید؛ که یک پارامتر مناسب برای ارزیابی عملکرد یک آنزیم می باشد. کلیات روش محاسبه فعالیت ویژه سیترات سنتتاز نیز مشابه COX است با این تفاوت که ضریب خاموشی در معادله سنجش فعالیت برابر است با ۱۳/۶ و طول موج مورد استفاده ۴۴۰ نانومتر و سوبسترای آن استیل کوآنزیم A می باشد.

سنجش فعالیت نسبی: به منظور متناسب و یکدست

نمودن محتوی میتوکندریایی (آنزیمی) در تمامی نمونه فعالیت نسبی COX محاسبه گردید. برای این منظور فعالیت ویژه COX بر فعالیت ویژه سیترات سنتتاز تقسیم شد (۱۷) و نتیجه برحسب درصد بیان گردید که همان فعالیت نسبی است. لازم به ذکر است که شرایط هیپوکسی بر فعالیت آنزیمی سیترات سنتتاز تاثیری ندارد که به همین دلیل برای همسان سازی نتایج در دو گروه شاهد و مورد، به کار رفت. هم چنین فعالیت نسبی پارامتری است که در ارزیابی

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار پارامترهای اندازه گیری شده در دو گروه بیمار (COPD) و نرمال

گروه بیمار	گروه نرمال	پارامتر ارزیابی شده
Mean \pm SD	Mean \pm SD	
۴ \pm ۶۰	۴ \pm ۵۶	سن بر حسب سال
۳ \pm ۳۴*	۵ \pm ۹۰	حداکثر حجم بازدمی در یک ثانیه اول (%FEV1) **
۰/۷۵ \pm ۷۹	۲/۵ \pm ۱۰۹	حجم کل بازدمی (%FVC) **
۴ \pm ۴۳*	۲ \pm ۸۲	نسبت FEV1/FVC
۲ \pm ۶	۲ \pm ۶	کل محتوی پروتئین (mg/ml)
۴ \pm ۷۹*	۲ \pm ۲۲	فعالیت ویژه آنزیم سیتوکروم اکسیداز بر حسب [A] ***
۵ \pm ۸۰	۵ \pm ۸۰	فعالیت ویژه آنزیم سیترات سنتتاز بر حسب [B] ***
۸ \pm ۹۸*	۰/۹ \pm ۲۷	{[A]/ [B]} \times 100 فعالیت نسبی (%)

*p<0.05

** %References

***nmol.min⁻¹.mg⁻¹ of cell extract protein

بحث و نتیجه گیری

می تواند از افزایش سرعت واکنش آنزیمی (از نظر سینتیکی) و یا ناشی از افزایش بیان (در سطح پروتئین آنزیم) باشد. پاسخ روشن به این سوال با بررسی میزان بیان مشخص می گردد که در حال حاضر

نتایج این مطالعه افزایش فعالیت COX (مطلق و نسبی) را در خون بیماران COPD نسبت به گروه کنترل را تأیید کرد. اما با این نتایج نمی توان مکانیسم این افزایش فعالیت را توضیح داد چرا که

پس از مصرف سیگار با نتایج تحقیق حاضر هماهنگ می باشد (۱۱). اما از آنجایی که در این گزارش مصرف سیگار به صورت مقطعی و برای یک بار در یک فرد غیر سیگاری بررسی شده، نمی توان به آن استناد کرد چرا که اکثر بیماران مبتلا به COPD یک دوره طولانی استعمال دخانیات را پشت سر گذاشته اند. لذا به عقیده نویسندگان افزایش فعالیت آنزیم COX که در این تحقیق دیده شد، به نوعی یک مکانیسم جبرانی در پاسخ به مصرف طولانی مدت سیگار است. همچنین نتایج این تحقیق می تواند توجیه کننده مصرف بالای اکسیژن در بیماران COPD در مقایسه با افراد سالم در مواجهه با کار فیزیکی یکسان باشد.

توجیه جنبه های بالینی نتایج این تحقیق نیازمند مطالعه بیشتر است. از آنجائیکه بیماری COPD از نظر عوامل بروز یک بیماری چند علتی می باشد لذا نویسندگان بر این باورند که پاسخ به سوال مطرح شده در اهداف تحقیق نیازمند بررسی تعداد بسیار بیشتری از بیماران می باشد تا بتوان از یافته های این تحقیق برای غربالگری افراد مستعد این بیماری استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری آقای دکتر محمدرضا سجودی و همکاران انستیتو ملی تحقیقات سل و بیماری های ریوی تشکر و قدردانی می گردد.

در آزمایشگاه ما در حال انجام است. در توجیه این افزایش فعالیت آنزیمی می توان نقش شرایط هیپوکسی را ذکر کرد. اما این مسئله که افزایش فعالیت آنزیم COX در این بیماران یک تغییر اولیه است یا یک تغییر ثانویه برای جبران شرایط هیپوکسیک، نیازمند تحقیقات بیشتر است. برای اطمینان از این نظر باید میزان کمی افزایش فعالیت آنزیم COX در بیماران COPD که سابقه مصرف سیگار ندارند در مقایسه با بیماران سیگاری، مورد ارزیابی قرار داد.

یافته های این مطالعه مشابه نتایج محققانی است که افزایش فعالیت این آنزیم را در عضله بیماران COPD یا افرادی که مبتلا به نارسایی های قلبی عروقی هستند و یا افراد سالمی که در ارتفاعات زندگی می کنند و به نوعی تحت تاثیر شرایط هیپوکسیک هستند، گزارش کرده اند (۱۰ و ۱۹ و ۲۰). همانگونه که ذکر شد یکی از ریسک فاکتور های اصلی COPD مصرف مداوم سیگار است. این نتایج ظاهراً با نتایج گزارش قبلی در رابطه با تاثیر سیگار بر فعالیت آنزیم COX در گلوبولهای سفید در تضاد است (۱۱). در این مطالعه تاثیر مصرف سیگار توسط افراد غیر سیگاری بر فعالیت آنزیم های زنجیره تنفسی از جمله COX در سه مرحله زمانی قبل، بعد و ۲۴ ساعت پس از مصرف ارزیابی شد. نتایج این مطالعه کاهش فعالیت آنزیمی را بلافاصله پس از مصرف و سپس افزایش فعالیت را در ۲۴ ساعت پس از مصرف نسبت به سطح فعالیت پیش از مصرف سیگار نشان داد. مشاهده می شود که نحوه تغییر فعالیت آنزیمی در ۲۴ ساعت

References

1. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5): 1256-76.
2. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349(9061): 1269-76.
3. American Thoracic Society. Definitions, epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and staging. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: S78-S83.
4. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1995; 8(8): 1398-420.
5. Hakhamaneshi MS. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Update 2006. Gold workshop report, Chapter 3. Available at: <http://www.goldcopd.com/download.asp?intId=379>.

6. Siskova A, Wihelm J. The effects of hyperoxia, hypoxia, and ischemia/reperfusion on the activity of cytochrome oxidase from the rat retina. *Physiol Res* 2001; 50(3): 267-73.
7. Capaldi RA. Structure and function of cytochrome oxidase. *Annu Rev Biochem* 1992; 59: 569-96.
8. Johns DR. The other human genome: mitochondrial DNA and disease. *Nat Med* 1996; 2(10): 1065-8.
9. Gennis R, Ferguson Miller S. Structure of cytochrome c oxidase, energy generator of aerobic life. *Science* 1995; 269(5227):1063-4.
10. Sauleda J, Garcia Palmer F, Wiesner RJ, et al. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(5 pt 1): 1413-17.
11. Alonso J.R, Cardellach F, Casademont J, Miro O. Reversible inhibition of mitochondrial complex IV activity in PBMC following acute smoking. *Eur Respir J* 2004; 23(2): 214-18.
12. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228(1): 35-51.
13. American Thoracic Society Official Statement. Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(3): 1107-36.
14. Roca J, Sanchis J, Agusti Vidal A, et al. Spirometric reference values for a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol. Respir* 1986; 22: 217-24 and gold workshop report. Update 2006 Chapter 3. Available at: <http://www.goldcopd.com/download.asp?IntId=379>.
15. Rosevaer P, Van Aken T, Baxter J, Ferguson Miller S. Alkyl glycoside detergents; a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 1980; 19(17): 4108-15.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
17. Wang H, Hiatt WR, Barstow TJ, Brass EP. Relationships between muscle mitochondrial DNA content, mitochondrial enzyme activity and oxidative capacity in man: alterations with disease. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999; 80(1): 22-7.
18. Jakobsson P, Jorfeldt L, Henricksson J. Metabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(2 pt1): 374-7.
19. Lundgren F, Dahllof AG, Schersten T, Bylund Fellenius AC. Muscle enzyme adaptation in patients with peripheral arterial insufficiency: spontaneous adaptation, effect of different treatments and consequences on walking performance. *Clin Sci (Lond)* 1989; 77(5): 485-93.
20. Reynafarje B. Myoglobin content and enzymatic activity of muscle and altitude adaptation. *J Appl Physiol* 1962; 17: 301-5.

ASSESSMENT OF CYTOCHROME C OXIDASE ACTIVITY IN WHITE BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

M.S. Hakhamaneshi (PhD)¹, S.A. Mesbah Namin (PhD)^{2*}, M. Houshmand (PhD)³,
A. Sahebghadam Lotfi (PhD)⁴

1. PhD in Clinical Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 2.*Associate Professor of Clinical Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, mesbahnamin@yahoo.com, 3. Associate Professor of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, 4. Professor of Clinical Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a lung disease which is characterized by decreased expiratory flow rates, increased pulmonary resistance and hyperinflation. In vitro studies indicate that the activity of cytochrome C oxidase (COX) can be directly regulated by the presence of molecular oxygen. The aim of this study was to assess cytochrome C oxidase activity in white cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease.

METHODS: This case-control study was performed on 42 patients under clinically stable conditions and 50 healthy sedentary volunteers of similar age. Whole blood was collected and white blood cells (WBCs) separated and lysed. The homogenates were centrifuged and the supernatants were used for total protein content, COX and citrate synthase activity. Absolute specific COX activity and relative activities were determined.

FINDINGS: Mitochondrial COX activity and specific activity (absolute & relative) in WBCs were significantly increased (about 3.5 time) in patients with COPD in comparison with control samples.

CONCLUSION: These results indicate that the activity of COX is increased in WBCs of patients with COPD but whether this is a primary or secondary change relevant to hypoxic condition in these patients is not clear and need further study.

KEYWORDS: COPD, COX, Mitochondria, Specific activity.

Journal of Babol University of Medical Sciences 2008; 10(1): 14-19

Received: September 16th 2007, Revised: September 20th 2007, Accepted: October 23rd 2007