DOI: 10.22122/jims.v36i472.9436 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۷۲/هفته‌ی چهارم اردیبهشت ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۱ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۲/۲۲

تعیین حساسیت پرتویی سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی بعد از تابش‌دهی با پرتوی X با روش سنجش MTT: مطالعه‌ی آزمایشگاهی

فرزانه رئیسی[۱]، الهام رئیسی[۲]، داریوش شهبازی گهرویی[۳]، اسفندیار حیدریان[۴]، محمد امیری[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazoliumbromide]، یک روش حساس و دقیق برای بررسی تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی پس از تابش‌دهی است. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، استفاده از روش MTT بر اساس تبدیل نمک تترازولیم به بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ از طریق سلول‌های زنده و بررسی شرایط مطلوب برای انجام این آزمایش در تعیین حساسیت پرتوی بود.

روش‌ها: چهار رده‌ی سلولی 4T1، L929، AGS و Human dermal fibroblasts (HDF) استفاده گردید. برای هر نوع سلول، پس از تابش‌دهی با دزهای ۰، ۲، ۴ و ۶ گری، روش MTT انجام شد. برای آزمون MTT، رابطه‌ی بین جذب و تعداد سلول، تعداد سلول بهینه‌ی کشت شده و زمان بهینه‌ی آزمون تعیین شد. روش MTT، ۶ روز بعد از تابش‌دهی یعنی ۶ برابر زمان دو برابر شدن سلول‌ها (Doubling time) انجام شد.

یافته‌ها: با افزایش دز تابش، بقای سلول‌ها کاهش یافت و تابش، مانع رشد سلول‌ها شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، پاسخ سلول‌های مختلف به تابش متفاوت است و آزمون MTT می‌تواند حساسیت سلول‌ها پس از تابش‌دهی را نمایش دهد.

واژگان کلیدی: سرطان، رده سلولی، بقای سلولی، پرتوی ایکس

ارجاع: رئیسی فرزانه، رئیسی الهام، شهبازی گهرویی داریوش، حیدریان اسفندیار، امیری محمد. **تعیین حساسیت پرتویی سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی بعد از تابش‌دهی با پرتوی X با روش سنجش MTT: مطالعه‌ی آزمایشگاهی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۲): ۲۵۰-۲۴۶

مقدمه

امروزه آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazoliumbromide] به عنوان یک روش متداول برای ارزیابی سمیت داروها و داروهای ضد سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲-۱).

با این وجود، در برخی موارد، محدودیت‌ها در استفاده از آزمون MTT وجود دارد که در این گونه موارد، می‌توان آن را توسط دیگر فورمازان‌ها مانند XTT، Water-soluble tetrazolium-1 (WST-1)، [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] یا MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] جایگزین کرد (۳). این روش‌ها، به طور کلی سمیت سلولی کمتر، حساسیت بیشتر و نیاز به مراحل آزمایش کمتری دارند (۴). علاوه بر این، بین MTT و روش‌های شمارش رادیو اکتیو سلول، همبستگی بسیار خوبی وجود دارد (۵).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آزمون MTT در مقایسه با آزمون

۱- پژوهشگر، مرکزتحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استادیار، گروه فیزیک پزشکی و پرتوشناسی، دانشکده‌ی پیراپزشکی و مرکزتحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- استاد،گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۵- متخصص پرتودرمانی- انکولوژی، بخش پرتودرمانی، کلینیک پارسیان، شهرکرد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: الهام رئیسی

Email: raeisi.e@skums.ac.ir

کلونوژنیک جهت تعیین درصد بقای سلولی، کارآمدتر است (۶، ۴). همچنین، مطالعه‌ی دیگری نشان داد که در تعداد کم سلول‌ها، بین تعداد سلول و جذب نوری اندازه‌گیری شده در آزمون MTT، ارتباط خطی وجود دارد (۷). در آزمون MTT در مقایسه با آزمون کلونوژنیک، عوامل متعددی بر فعالیت متابولیک یا انسداد سلولی اثر می‌گذارند و منجر به نتایج ریخت‌شناسی می‌شود که هر گونه تغییری یافت می‌شود. در حالی که تغییرات ریخت‌شناسی با استفاده از روش‌های دیگر نشان داده شده است. بنابراین، آزمون MTT ممکن است برای تعیین فعالیت متابولیک سلولی نسبت به سایر ویژگی‌های رشد سلولی مانند بقای سلول به عنوان یک روش دقیق مورد استفاده قرار گیرد (۸).

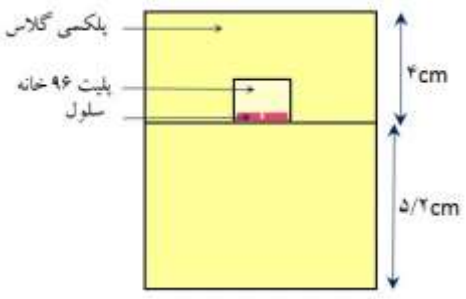
روش کلونوژنیک، رایج‌ترین روش برای اندازه‌گیری پاسخ سلول‌ها به پرتو در علوم تابش است (۹). با این حال، آزمون کلونوژنیک به دلیل بعضی معایب نظیر زمان طولانی برای تشکیل کلونی، اثر طولانی مدت آلودگی، عدم توانایی اندازه‌گیری سلول‌هایی بدون پتانسیل کلونوژنیک و خطاهای شمارش کلونی ناشی از هم‌پوشانی کلونی‌ها، محدود شده است (۱۰). در حالی که برخی از روش‌ها نظیر آزمون MTT با اندازه‌گیری اندازه‌ی نمونه‌های بزرگ در زمان کوتاهی می‌توانند بر معایب تشکیل کلونی غلبه کنند. علاوه بر این، MTT یک روش ارزان، ساده و نیمه خودکار است (۱۱). بنابراین، هدف از انجام این مطالعه، بررسی حساسیت پرتوی سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم پس از تابش‌دهی با پرتوی ایکس با استفاده از آزمون سنجش MTT بود.

روش‌ها

کشت سلولی: رده‌های سلولی سرطان معده‌ی انسانی (AGS)، سرطان پستان موش (4T1)، سلول‌های طبیعی فیبروبلاست پوستی انسانی (Human dermal fibroblasts یا HDF) و فیبروبلاست موشی (L929) از مؤسسه‌ی پاستور ایران خریداری شد. همه‌ی سلول‌ها در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) حاوی ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Sigma, USA) کشت داده شدند. سلول‌ها در شرایط استاندارد دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد از گاز دی‌اکسید کربن در انکوباتور نگهداری شدند. محیط کشت هر ۲ روز یک بار تعویض شد.

تابش سلولی: جهت بررسی تابش سلولی تعداد ۵۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا به کف پلیت بچسبند. سپس، سلول‌ها تحت تابش فوتون ایکس با انرژی ۶ مگاولت در دزهای ۰، ۲، ۴ و ۶ گری با آهنگ دز ۲۰۰ سانتی‌گری/دقیقه، با استفاده از شتاب دهنده‌ی خطی (Siemens, Germany) قرار گرفتند. گروه شاهد تمام استرس‌های مربوط به تابش‌دهی را در شرایط آزمایشگاهی مشابه از لحاظ دما، فشار، رطوبت و غیره دریافت کردند، اما این سلول‌ها پرتوی دریافت نکردند. تمام گروه‌های مورد مطالعه با یک دز واحد تابش‌دهی شدند. تابش‌دهی با فاصله‌ی منبع از سطح (۱۰۰ سانتی‌متر = Source surface distance یا SSD) و میدان ۲۰ × ۲۰ سانتی‌متر مربع انجام شد. شمایی از فانتوم پلکسی‌گلاس (Polymethylmethacrylate) ساخته شده برای این مطالعه، در شکل ۱ نشان داده شده‌است.

محلول و آزمون MTT: محلول MTT (Sigma, USA) به میزان ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma, USA) تهیه و فیلتر شد. آزمون MTT، ۶ روز پس از تابش‌دهی انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany) جایگزین محلول MTT شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Stat Fax-2100 model, Spain) در طول موج ۵۴۰ نانومتر، خوانده شد.



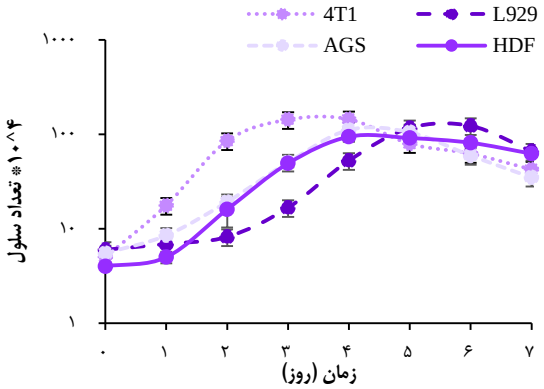
شکل ۱. نمای مقطعی از فانتوم مورد استفاده برای تابش سلول‌ها

تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز آماری بین گروه‌های مورد و شاهد با استفاده از نرم‌افزار Prism graphpad (Version 5, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) و آزمون‌های Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunn انجام گرفت. داده‌های آماری در سطح $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمام آزمایش‌ها سه بار انجام شدند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید.

یافته‌ها

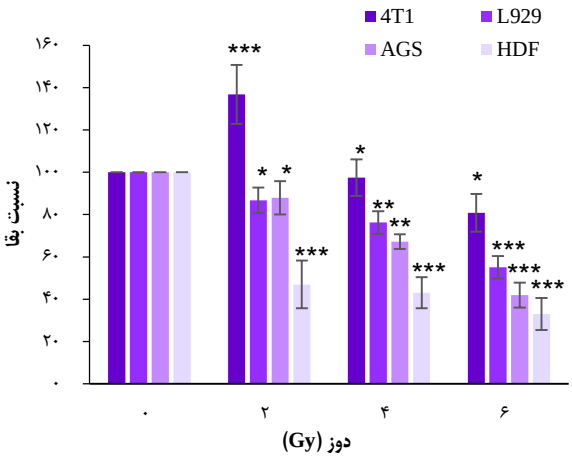
شکل ۲، نتایج منحنی رشد سلول‌های 4T1، L929، AGS و HDF

در یک دوره‌ی یک هفته‌ای را نشان می‌دهد.



شکل ۲. منحنی رشد سلول‌های 4T1، L929، AGS و Human dermal fibroblasts (HDF) طی ۷ روز

شکل ۳، نشان می‌دهد که با افزایش دز تابش، نسبت بقای سلول‌ها کاهش می‌یابد. نتایج نشان داد که سلول‌های 4T1 نسبت به سایر سلول‌های بررسی شده مقاوم به تابش بود و در دز ۲ گری، نسبت بقای سلولی سلول‌های 4T1 کاهش نیافت؛ بلکه افزایش یافت. در حالی که دز ۶ گری منجر به مرگ سلول‌های 4T1 شد. بر خلاف سلول‌های 4T1، سلول‌های HDF، L929 و AGS حساسیت بیشتری به دز ۲ گری نشان دادند. سلول‌های L929 و AGS بالاترین میزان مرگ و میر را در دز ۶ گری نشان دادند. با این حال، سلول‌های HDF نسبت به سایر سلول‌های مورد مطالعه بیشتر به تابش حساس بودند؛ چرا که مرگ و میر قابل توجهی را در دز ۲ گری نشان دادند ($P < ۰/۰۰۱$).



شکل ۳. نسبت بقای سلولی سلول‌های 4T1، L929، AGS و Human dermal fibroblasts (HDF) تحت تابش با دزهای مختلف پرتوی X (۰، ۲، ۴ و ۶ گری)

$P < ۰/۰۵^{*}$، $P < ۰/۰۱^{**}$، $P < ۰/۰۰۱^{***}$

بحث

آزمون‌های کلونوژنیک و MTT برای محاسبه‌ی بقای سلولی پس از تابش‌دهی پرتوی یونیزان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات اخیر، گزارش کرده‌اند که منحنی‌های بقای حاصل از آزمون MTT در هم‌خوانی خوبی با نتایج آزمون کلونوژنیک هستند (۱). بر اساس مطالعات انجام گرفته، زمان بهینه برای سنجش حساسیت پرتوی سلول‌ها با استفاده از آزمون‌های MTT و کلونوژنیک، ۷-۴ برابر زمان دو برابر شدن سلول‌ها (Doubling time یا DT)، می‌باشد (۱۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آزمون MTT در مقایسه با آزمون کلونوژنیک جهت تعیین درصد بقای سلولی، کارآمدتر است (۶-۵).

با توجه به روش‌های متعدد سنجش حساسیت پرتوی سلول‌ها، مطالعات برای جایگزین نمودن روش مناسب، ارزان‌تر و ساده‌تر، ادامه داشته و بیشترین تمرکز بر روی آزمون MTT بوده است (۱۳). در مطالعه‌ای، نتایج آزمون MTT برای NCIH630 با انحراف معیار حدود ۱۰ درصد، اما برای بقیه‌ی موارد سلولی، انحراف معیار کمتر از ۵ درصد گزارش شده است (۱۴). این تفاوت انحراف معیار، ممکن است ناشی از تغییر در رشد در محیط کشت سلول‌های مختلف و نیز خطای آزمایش باشد. همچنین، به غیر از سلول Protein C inhibitor (PCI-1)، بقای سلول‌های دیگر در آزمون MTT کمی بالاتر از آزمون کلونوژنیک مشاهده شده است. اگر چه در دزهای تابشی ۰، ۲ و ۴ گری، اختلاف معنی‌داری در درصد بقای سلول‌های اندازه‌گیری شده توسط آزمون‌های MTT و کلونیک مشاهده نشده است، اما در دز تابشی ۶ گری، درصد بقای اندازه‌گیری شده با هر دو آزمون، اختلاف معنی‌داری نشان داد (۱۴).

Sieuwerts و همکاران، خصوصیات رشد و بقای سلول‌ها را با آزمون MTT بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که در آزمونMTT، زمانی که تعداد سلول‌ها کم است، بین تعداد سلول‌ها و چگالی نوری (Optical density یا OD) اندازه‌گیری شده ارتباط خطی وجود دارد (۸).

در مطالعه‌ی دیگری، Buch و همکاران (۹)، نسبت بقای سلولی را با استفاده از هر دو آزمون MTT و کلونوژنیک بررسی کردند و نتیجه گرفتند که در تعیین نسبت بقای سلول، با استفاده از آزمون MTT، برخی از خصوصیات و پارامترهای مهم نظیر زمان دو برابر شدن سلول نادیده گرفته شده است. برای برطرف نمودن این محدودیت، از آزمایش‌های MTT پیوسته با چندین نمونه استفاده کرده‌اند که تعداد مختلف سلول در هر چاهک استفاده و تعداد کلونی‌ها برای یک دوره‌ی زمانی ۹ روز بعد از تابش شمارش شده است (۱۲).

در مطالعه‌ی دیگری، نشان داده شده است که در محیط

آزمایشگاهی، پس از تابش‌دهی با دز ۶ گری، بین آزمایش‌های چند رنگی و کلونی در سلول‌های مختلف، همبستگی معنی‌داری وجود دارد ($R2 > 96$ درصد) (۱۵)؛ در تحقیق حاضر نیز برای دز ۶ گری این یافته وجود داشت.

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش دز تابش، میزان بقای سلول‌ها کاهش می‌یابد و تابش نیز مانع رشد سلول‌ها می‌شود. روش MTT با شرایط مطلوب که شامل بازده کشت و زمان دو برابر شدن هر رده‌ی سلولی بود، انجام پذیرفت. بنابراین، آزمون MTT دارای توانایی قابل توجهی برای بررسی تکثیر سلول‌ها پس از تابش‌دهی با پرتوی X می‌باشد و می‌تواند به عنوان روش مناسب برای تعیین نسبت بقای سلول‌های تابش دیده مورد استفاده گیرد. با توجه به این نکته که متغیرهای انرژی فوتون و زمان ممکن است بر بقای سلول‌های سرطانی تأثیر بگذارد، مطالعات بیشتری نیاز است تا در مورد تأثیر این دو متغیر بر بقای سلول‌های سرطانی، بتوان به اطلاعات بیشتری دست یافت.

نتیجه‌گیری نهایی این که آزمون MTT در شرایط مطلوب یعنی بازده کشت در هر رده‌ی سلولی و زمان دو برابر شدن سلول‌ها، به خوبی پاسخ سلول‌های مختلف به تابش را نمایش می‌دهد. این آزمون، حساسیت سلول‌ها به انرژی‌های مختلف تابش و بقای سلول‌های سرطانی را با توجه به مقادیر افزایش دز پرتو به خوبی نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به شماره‌ی طرح ۲۲۴۶ و ۲۶۸۰ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. همچنین، از کارکنان بخش پرتودرمانی بیمارستان پارسیان شهرکرد به ویژه آقای مهندس محمدرضا زاهدی و خانم فریبا عینی، بابت کمک‌های ارزشمندشان در طول این مطالعه، تشکر و قدردانی می‌شود..

References

1. Ghahremani F, Shahbazi-Gahrouei D, Kefayat A, Motaghi H, Mehrgardi MA, Javanmard SH. AS1411 aptamer conjugated gold nanoclusters as a targeted radiosensitizer for megavoltage radiation therapy of 4T1 breast cancer cells. RSC Adv 2018; 8(8): 4249-58.
2. Raeisi F, Raeisi E, Shahbazi-Gahrouei D, Heidarian E, Amini F. A comparison of thiazolyl blue (MTT) versus sulforhodamine B (SRB) Assay in assessment of antiproliferative effect of bromelain on 4T1, AGS, and PC3 cancer cell lines. J Isfahan Med Sch 2016; 35-443: 1056-61.
3. Shahbazi-Gahrouei D, Abdolahi M, Zarkesh-Esfahani SH, Laurent S, Sermeus C, Gruettner C. Functionalized magnetic nanoparticles for the detection and quantitative analysis of cell surface antigen. Biomed Res Int 2013; 2013: 349408.
4. Ramsay J, Ward R, Bleehen NM. Radiosensitivity testing of human malignant gliomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 24(4): 675-80.
5. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods 1986; 93(2): 157-65.
6. Wasserman TH, Twentyman P. Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988; 15(3): 699-702.
7. Kato T, Irwin RJ, Jr., Prout GR, Jr. Cell cycles in two cell lines of human bladder carcinoma. Tohoku J Exp Med 1977; 121(2): 157-64.
8. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33(11): 813-23.
9. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. Radiat Oncol 2012; 7: 1.
10. Courtenay VD, Mills J. An in vitro colony assay for human tumours grown in immune-suppressed mice and treated in vivo with cytotoxic agents. Br J Cancer 1978; 37(2): 261-8.
11. Azria D, Larbouret C, Cunat S, Ozsahin M, Gourgou S, Martineau P, et al. Letrozole sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation. Breast Cancer Res 2005; 7(1): R156-R163.
12. Price P, McMillan TJ. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. Cancer Res 1990; 50(5): 1392-6.
13. Mu X, Lofroth PO, Karlsson M, Zackrisson B. The effect of fraction time in intensity modulated radiotherapy: theoretical and experimental evaluation of an optimisation problem. Radiother Oncol 2003; 68(2): 181-7.
14. Hong S, Kim IH. The Optimal Condition of Performing MTT Assay for the Determination of Radiation Sensitivity. Radiat Oncol J 2001; 19(2): 163-70.
15. Arab-Bafrani Z, Shahbazi-Gahrouei D, Abbasian M, Fesharaki M. Multiple MTS Assay as the Alternative Method to Determine Survival Fraction of the Irradiated HT-29 Colon Cancer Cells. J Med Signals Sens 2016; 6(2): 112-6.

DOI: 10.22122/jims.v36i472.9436 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 472, 4th Week, May 2018**

Received: 06.01.2018 Accepted: 21.04.2018 Published: 12.05.2018

Comparison of the Radiosensitivity of Cancer and Normal Cells to X-ray Irradiation Using MTT Assay: An In-Vitro Study

Farzaneh Raeisi[1], Elham Raeisi[2], Daryoush Shahbazi-Gahrouei[3], Esfandiar Heidarian[4], Mohammad Amiri[5]

Original Article

Abstract

Background: MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] is a sensitive and accurate method to determine survival fraction of irradiated cancer cells. The aim of present study was to evaluate the radiosensitivity of cancer cells X-ray Irradiation in comparison to normal cells using the MTT assay.

Methods: Four cancer cell lines were used, the mouse breast 4T1 cells, the mouse fibroblast L929 cells, the human gastric AGS cells, and the human dermal fibroblasts (HDF) cells. For each cell line, MTT assay was carried out after irradiation to 0, 2, 4, and 6 Gy. For MTT assay, the relationship between absorbed dose and cell number, optimal seeding of cell number, and optimal timing of assay were determined. Then, MTT assay was performed when the irradiated cells had regained exponential growth, or when the non-irradiated cells had undergone doubling times.

Findings: With increasing radiation dose, the mortality of the cells increased, and radiation blocked cell growth.

Conclusion: The response of different cells to irradiation was different. MTT assay may successfully be used, and also may distinguish cell responses to different photon energies. MTT assay was undertaken with optimal assay conditions, and showed the sensitivity of cells to irradiation with regard to the plating efficiency of each cell line, and doubling time at least.

Keywords: Cancer, Cell lines, Cell survival, X-rays

Citation: Raeisi F, Raeisi E, Shahbazi-Gahrouei D, Heidarian E, Amiri M. **Comparison of the Radiosensitivity of Cancer and Normal Cells to X-ray Irradiation Using MTT Assay: An In-Vitro Study.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(472): 246-50.

1- Researcher, Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2- Assistant Professor, Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute AND Department of Medical Physics and Radiology, School of Allied Medical Sciences, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
3- Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Professor, Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
5- Radiation Oncologist, Department of Radiation Oncology, Parsian Clinic, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Elham Raeisi, Email: raeisi.e@skums.ac.ir