ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxic Effects of Lagenaria siceraria Standl. Extract on Cancer Cell Line

Mohammad Shokrzadeh[1],
Atefeh Parvaresh[2],
Somayeh Shahani [3],
Emran Habibi [3],
Zavosh Zalzar [2]

[1] pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD Student in Pharmacology, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 22, 2012 ; Accepted November 26, 2012)

Abstract

Background and purpose: In most cases, drugs used for chemotherapy are ineffective and have unpleasant side-effects. This has made scientists to find more effective drugs with less toxicity. *Lagenaria siceraria* is an important medicinal plant in the world and anti-tumoral activity of *Lagenaria* species has been reported in some studies. This study was designed to evaluate the anti-tumoral effect of methanolic extract isolated from *Lagenaria siceraria* on lung cancer cell line.

Materials and methods: Hydroalcoholic extract of *Lagenaria siceraria* was prepared by percolation method. Cultivated cancer cell line of lung (A549) was incubated with different concentrations (0.1, 1, 10, 100, 250, 1000, 500, and 5000 µg/ml) of the extract for 72 hours and cell growth inhibition was determined using MTT assay. Cisplatin was considered as positive control. The resulting data was analyzed using ANOVA and t-test.

Results: Results of MTT assay showed strong and dose-dependent inhibition of cancer cell growth by the extract of *Lagenaria siceraria*. This extract caused a significant decrease in proliferation of lung cancer cell line (IC50 = 93.094 ± 6.5 µg/ml).

Conclusion: The results of this study suggest anti-tumoral activity of *Lagenaria siceraria*, however, isolation of efficient compounds of this extract and evaluation of their effects on tumor-bearing animal models are suggested.

Keywords: *Lagenaria siceraria*, tumor cell lines, growth inhibitors, MTT assay

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(97): 225-230 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۷ بهمن سال ۱۳۹۱ (۲۳۰-۲۲۵)

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره گیاه Lagenaria siceraria بر روی رده سلول سرطانی ریه (A549)

محمد شکرزاده[۱]
عاطفه پرورش[۲]
سمیه شاهانی[۳]
عمران حبیبی[۳]
زاوش زال زر[۲]

چکیده

سابقه و هدف: شیمی درمانی یکی از روش‌های درمان سرطان می‌باشد، اما فقدان سایتوتوکسیسیتی انتخابی اغلب منجر به بروز عوارض جانبی غیرقابل تحمل می‌گردد.امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان به دلیل عوارض جانبی کمتر از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است گیاه Lagenaria siceraria Standl به دلیل دارا بودن ترکیبات پلی فنلیک، کوکوربیتاسین‌ها، پکتین، فلاونوئید و ساپونین برای مطالعات سمیت سلولی با اهمیت می‌باشد. در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک عصاره میوه گیاه بر رده سلول سرطانی ریه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره هیدروالکلی میوه گیاه به روش پرکولاسیون تهیه شد و سپس اثرات محلول‌های حاوی نمونه با غلظت‌های مختلف، (۵۰۰۰ µg/ml، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۱۰، ۱، ۰/۱)، بر روی رده سلولی سرطانی ریه (A549) توسط متد MTT بررسی شد. داروی سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. محاسبات آماری برای مقایسه IC_{50} با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism Ver.3 انجام و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس (ANOVA) و t-test صورت گرفته است.

یافته‌ها: یافته‌ها حاکی از آن است که میزان IC50 داروی ضد سرطان سیس پلاتین به عنوان یک داروی رایج در بازار به طور معنی‌داری کمتر از عصاره گیاه کدو قلیانی می‌باشد با این حال عصاره این گیاه اثر مهارکنندگی رشد قابل توجهی بر روی سلول سرطانی ریه نشان داد.

استنتاج: نتایج نشان داد که عصاره گیاه Lagenaria siceraria یک ترکیب سایتوتوکسیک مؤثر بر روی سلول‌های سرطانی ریه می‌باشد و و باید بررسی‌های بیشتری در جهت یافتن ترکیبات مؤثر موجود در عصاره گیاه صورت گیرد تا گامی در جهت یافتن و طراحی داروهای جدید و مؤثر در درمان سرطان باشد (IC50 =۹۳/۰۹۴ ± ۶/۵ µg/ml).

واژه های کلیدی: Lagenaria siceraria، رده سلولی سرطانی، IC_{50} ، MTTassay

مقدمه

امروزه سرطان‌های گوناگون در سراسر جهان عامل بخش زیادی از مرگ و میر هستند. روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی درمان، رادیوتراپی، هورمون درمانی، ایمنوتراپی و ... اشاره داشت. در خصوص سرطان ریه، نیز از روش‌های متفاوت استفاده می‌شود که شیمی

مؤلف **مسئول: عاطفه پرورش**- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: atefeh_parvaresh@yahoo.com
۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی/فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. دانشجوی دکترای داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
تاریخ دریافت : ۹۱/۷/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۱/۷/۲۲ تاریخ تصویب : ۹۱/۹/۶

درمانی سیستمیک یکی از این روش‌ها می‌باشد. اما فقدان سمیت انتخابی اغلب منجر به بروز عوارض جانبی غیرقابل تحمل می‌گردد. غیر از روش‌های رایج ذکر شده امروزه استفاده از گیاهان دارویی (خصوصاً گیاهان بومی) در درمان سرطان از اهمیت زیادی برخوردار است. از طرف دیگر استفاده از کشت سلولی به منظور سنجش سایتوتوکسیسیته مواد شیمیایی، دارویی، آفت‌کش‌ها و بررسی In vitro تمامی ترکیبات طبیعی و سنتتیک و ... پیشرفت شگرفی را پیدا کرده است(۱). گیاه دارویی کدو قلیانی با نام علمی Lagenaria siceraria متعلق به خانواده Cucurbitaceae می‌باشد.این خانواده تقریباً دارای ۱۱۸جنس و ۸۲۵ گونه می‌باشد. این جنس یک گونه گیاه یک ساله رونده دارد که معمولاً در مناطق گرم‌سیری پراکنده است و بیشتر به خاطر زینتی بودن آن کاشته می‌شود. این گیاه در زبان فارسی به نام کدو قلیانی شهرت دارد، اما در زبان انگلیسی به نام Bottle Gourd و در زبان هندی و اردو به نام Lauki شناخته می‌شود. گیاه کدو قلیانی، در اصل بومی هند و افریقا می‌باشد(۴-۲).

میوه گیاه Lagenaria Siceraria منبعی از ویتامین C، بتاکاروتن، ویتامین‌های گروهB، پکتین، سطوح بالای کولین به عنوان فاکتور لیپوتروپیک، ساپونین، روغن‌های ثابت ضروری و نیز شامل کوکوربیتاسین B،D،G،H می‌باشد. کوکوربیتاسین‌ها دسته‌ای از تری ترپنوئیدهای چهار حلقه‌ای هستند که به علت دارا بودن خواص سایتوتوکسیک و ضد توموری مورد توجه قرار گرفته‌اند، کوکوربیتاسین ها به طور قراردادی به ۱۲ گروه شامل A-T تقسیم شده‌اند، خصوصاً کوکوربیتاسین E دارای اثرات سایتوتوکسیک می‌باشد. اثرات عصاره میوه کدو قلیانی علاوه بر موارد مذکور ناشی از فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدهایی مانند فوکوسترول و کامپسترول، فنول و گلیکوزید هم می‌باشد(۶-۴).

یک پروتئین جدید مهارکننده فعالیت ریبوزومی (RIP) هم به نام Lagenin از عصاره ابی لئوفیلیزه شده دانه‌های گیاه Laganaria siceraria جدا شده است که دارای خواص ایمونوساپرسیو، ضد ویروس و ضد HIV می‌باشد. این گیاه دارای اثرات انتی اکسیدانت، کاردیوپروتکتیو، هپاتوپروتکتیو، ضد درد، ضد التهاب، ضدهایپرلیپیدمی، ضدهایپرگلایسمی، دیورتیک و تنظیم‌کننده سیستم ایمنیست(۱۰-۷) در مطالعه‌ای که توسط آقای kaushik Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، پلی ساکاریدی محلول در آب از میوه گیاه Lagenaria siceraria جدا شد که با متد NMR شناسایی و با متد MTT اثر سمیت ان بر روی خط سلولی ادنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) ثابت شد(۸،۷،۳).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط آقای p,saha و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد، اثر آنتی توموری عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاه Lagenaria siceraria بر سلول‌های Ehrlich'sAscites Carcinoma با القاء به موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت و اثرات آن با داروی 5-FU مقایسه شد، و در نهایت اثر آنتی‌توموری آن با سنجش طول مدت زندگی موش‌ها و سنجش پارامترهای هماتولوژیکی، بیوشیمیایی بافت کبد موش‌ها اثبات شد(۹).

با توجه مطالعات صورت گرفته مشخص شده که اولاً مطالعه‌ای روی میوه گونه مورد بررسی این گیاه به عمل نیامده ثانیاً اثرات عصاره هیدروالکلی این گیاه روی رده سلولی سرطان ریه نیز مطالعه انجام نشده(۱۰-۳) و لذا از آن جایی که تا کنون تحقیق مشابهی از گونه Lagenaria siceraria در ایران بر روی رده سلولی سرطانی ریه انجام نشده، لذا ما اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه به منظور مهار رشد سلول‌های مورد نظر (سرطانی ریه)را مورد مطالعه قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

الف) نحوه عصاره گیری سال ۱۳۹۰

نوع مطالعه آزمایشگاهی (Experimental) بوده و در مرحله اول جمع‌آوری میوه گیاه کدو قلیانی

(Lagenaria siceraria) بود که از استان مازندران روستای دنگسرک شهرستان نکاء در اوایل فصل پاییز سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید و با نمونه هرباریومی موجود در دانشکده داروسازی تهران مطابقت داده شده و نام علمی گیاه توسط متخصص مربوطه تأیید شده است. گام بعدی خشک کردن میوه گیاه مورد نظر بوده که این امر زیر هود و در دمای اتاق انجام پذیرفت تا گیاه کاملاً خشک گردید. سپس گیاه خشک شده به کمک هاون شکسته و دانه‌هایش از پوسته گوشتی جدا شد، سپس پوسته میوه را که مورد نیاز بود به کمک آسیاب دستی خرد و ریز شد. در مرحله بعد ۵۰۰ گرم از پوسته خشک شده به روش پرکولاسیون و با حلال متانول ۸۰ درصد عصاره گیری گردید. عمل عصاره گیری ۳ بار و با فاصله زمانی ۴۸ ساعت انجام شد. عصاره با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء دوار (Rotary evaporate)تغلیظ و به کمک دستگاه فریز درایر (Freeze dryer) در دمای ۴۵- به مدت ۳ روز، کاملاً خشک شد و به شکل پودر در آمد. در نهایت پودر خشک در ظرف شیشه‌ای در بسته و درون یخچال به دور از گرما و نور نگه داری شد تا زمان انجام آزمایشات کشت سلولی فرا برسد.

ب) نگهداری و کشت سلولی

در این مطالعه رده سلولی سرطانی ریه انسان A549 که از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهران خریداری شده‌اند از پاساژهای سلولی بین ۲۶ تا ۳۱ در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵ g/lسدیم بیکربنات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین که در انکوباتور (BINDER, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن استفاده شد. برای انجام تست‌های مختلف، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا شده و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک سی‌سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد(۸،۳).

ج) بررسی سمیت سلولی گیاه کدو قلیانی با روش MTT assay

به منظور بررسی اثر عصاره کدو قلیانی بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی از روش رنگ سنجی‌ام تی‌تی استفاده شد(۱۴،۱۳). این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است. در این روش میزان ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت حاوی تعداد 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های ۰/۱ ، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه کدو به سلول‌ها اضافه شد و طی ۷۲ ساعت انکوبه شد، پس از طی زمان مذکور به هر چاهک پلیت ۲۰ میکرو لیتر ام تی‌تی (از شرکت سیگما با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد. پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی ام تی‌تی به دقت خارج شد و به هر خانه پلیت میزان ۵۰ میکرو لیتر محلول DMSO رقیق شده جهت حل کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر قرائت شد(۸،۷). نتایج حاصله به صورت درصد بقای سلولی در برابر غلظت عصاره گزارش می‌شود. درصد بقای سلولی این‌گونه محاسبه می‌شود:

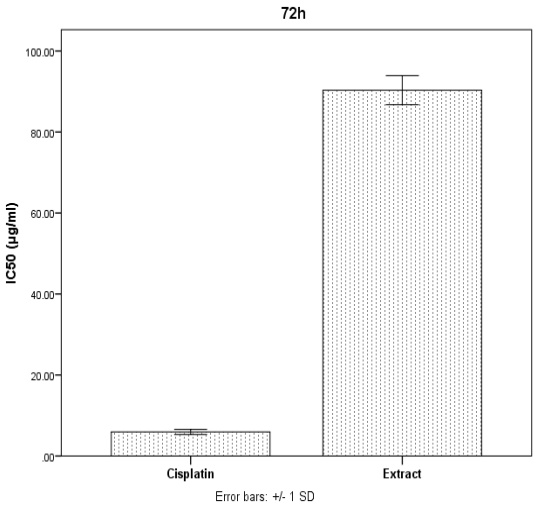
۱۰۰× (جذب نوری کنترل/ جذب نوری تست) = میزان بقای سلولی

تحلیل آماری داده‌ها با روش ANOVA و T-test انجام شد.

یافته‌ها

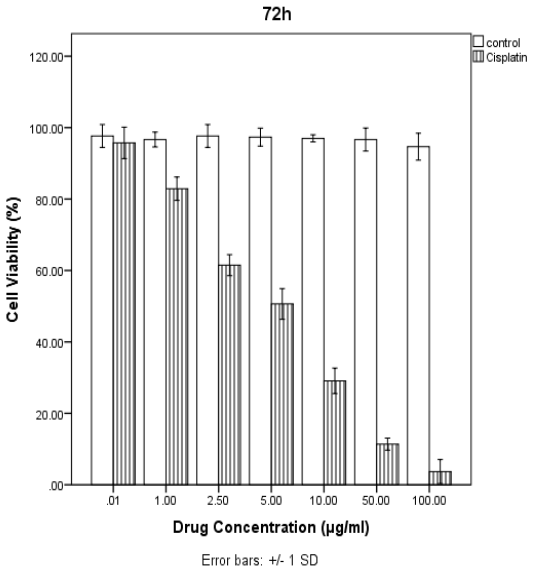
مقدار IC50 عصاره گیاه کدو قلیانی بر روی سلول سرطانی ریه (A549)، ۶/۵ ± ۹۳/۰۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد، و این مقدار برای داروی ضد سرطان سیس پلاتین ۰/۳۵ ± ۵/۳۷ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. مقایسه داده‌های IC_{50} عصاره گیاهی و داروی سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطانی ریه (A549) نشان داد که تفاوت معناداری بین تمامی داده‌ها وجود دارد ($p < ۰/۰۵$).

نتایج نشان داد که IC_{50} داروی سیس پلاتین به طور معنی‌داری بسیار کمتر از IC_{50} عصاره گیاه بوده است ($p < ۰/۰۱$) (نمودار شماره ۱).

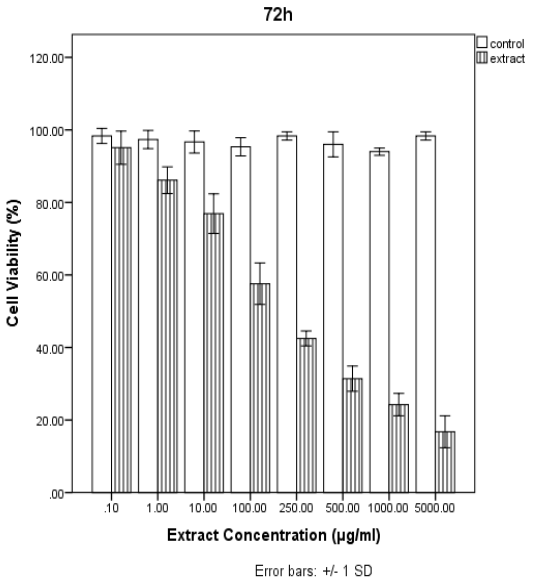


نمودار شماره ۱: مقایسه میزان IC50 عصاره گیاه Lagenaria siceraria و داروی سیس پلاتین بر روی رده A549 طی زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت ($p < ۰/۰۱$)

با استفاده از میزان جذب‌های خوانده شده در رده سلولی A549، میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها (viability%) پس از مواجهه با عصاره گیاه کدو قلیانی و اتمام تست MTT تعیین گردید (نمودارهای شماره ۲ و۳).



نمودار شماره۲: میزان بقای سلولی (درصد) رده A549 در مواجهه با داروی سیس پلاتین طی زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت



نمودار شماره ۳: میزان بقای سلولی (درصد) رده A549 در مواجهه با عصاره گیاه Lagenaria siceraria طی زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت

بحث

استفاده از روش‌های کشت سلولی درک بسیار عمیق‌تری از تأثیر داروهای مختلف بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال پدید می‌آورد. اثرات و تغییراتی که ترکیبات مختلف مانند سیس پلاتین و عصاره گیاه کدو

قلیانی (که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند) بر سلول‌ها در فضای کنترل شده و قابل بررسی کشت سلولی ایجاد می‌نمایند، شناسائی دقیق‌تر مکانیسم‌ها و اثرات بیولوژیکی آن‌ها و هم چنین اثرات آن‌ها بر فاکتورهای متفاوت داخل سلولی را امکان پذیر می‌سازد. این امکانات شناسایی هر چه بهتر فرآیندها و فعل و انفعالات داخل سلولی طی دارو درمانی سرطان را ممکن می‌سازد که می‌تواند به ارتقاء روش‌های درمانی منجر گردد(۱۰). به هر حال یکی از مهم‌ترین کاندیداهای سنتز داروهای ضد سرطان به منظور مصرف در شیمی درمانی سرطان‌ها، ترکیبات دارای اثرات سمی و خصوصاً سمیت سلولی هستند، که امروزه سمیت سلولی آن‌ها با استفاده از روش‌های سنجش سمیت بر روی کشت سلولی و بافتی قابل اندازه گیری می‌باشد(۱۱). از سوی دیگر، امروزه ترکیبات با منشأ طبیعی (گیاهی، حیوانی و معدنی)، به علت فراوانی، عوارض جانبی و تداخلات دارویی کمتر، ارزان بودن و...، کانون توجه داروسازان و پزشکان به منظور سنتز داروهای نوین و درمان بیماری‌ها (خصوصاً بیماری‌هایی که درمان و رژیم دارویی قطعی یا دارای اثربخشی کافی آن‌ها وجود ندارد) می‌باشند(۱۰،۱۱). با نظر اجمالی به جداول، نمودارها و مطالب ارائه شده در نتایج می‌توانیم دریابیم که گرچه تفاوت معنی‌داری میان مقدار IC_{50} عصاره گیاه Lagenaria siceraria در مقایسه با داروی ضد سرطان سیس پلاتین وجود دارد، اما می‌توان ادعا کرد که عصاره این گیاه دارای اثر مهارکنندگی رشد قابل توجهی بر روی رده سلولی سرطانی ریه (A549) بوده است. داروی سیس پلاتین یک داروی رسمی است که به طور وسیعی در درمان سرطان‌های ریه، تخمدان، بیضه، مثانه و لنفوم و ... به کار می‌رود، علت اختلاف معنی‌دار IC_{50} داروی سیس پلاتین با عصاره گیاه کدو قلیانی بر رده سلولی مورد ارزیابی در این می‌باشد که داروی سیس پلاتین یک ترکیب خالص شیمیایی است، اما عصاره گیاه کدو قلیانی مخلوط تعداد زیادی از ترکیبات از جمله کوکوربیتاسین، ماده غیرفعال کننده ریبوزوم (lagenin)، پلی ساکارید، فلاونوئید و ... می‌باشد که چه بسا در نتیجه مطالعات بیشتر، ترکیبات خالص شده بتوانند با اثربخشی قوی‌تر و عارضه کمتر جایگزین مناسبی برای داروهایی همچون سیس پلاتین باشند(۱۲،۱۳).

با توجه به سایر مطالعات صورت گرفته بر روی اجزاء این گیاه (دانه- گل و...)، مشخص شده که گیاه کدو قلیانی به دلیل دارا بودن ویتامین C، بتاکاروتن، ویتامین‌های گروه B، پکتین، سطوح بالای کولین به عنوان فاکتور لیپوتروپیک، ساپونین، کوکوربیتاسین B، فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدهایی مانند فوکوسترول و کامپسترول، فنول، گلیکوزید، یک پروتئین مهارکننده فعالیت ریبوزومی به‌نام Lagenin و پلی ساکاریدی محلول در آب سمیت بر روی رده های سلول سرطانی MCF-7, HepG2, EAC داشته از جمله گیاهان دارویی با ارزشی به شمار می‌رود که ما نیز اثر عصاره هیدرولیک میوه این گیاه را بر روی رده سلولی سرطانی ریه (A549) بررسی نمودیم که خوشبختانه مشخص گردیده که عصاره میوه این گیاه توانسته مهار قابل ملاحظه‌ای را بر این رده سلولی سرطانی داشته و با مطالعه بیشتر بر روی میوه این گیاه ترکیبات خالص را جداسازی و پس از مطالعات تکمیلی به ترکیبی دست یافت که بتوان از آن در درمان سرطان ریه استفاده درمانی نمود(۱۰-۳). لذا ما پیشنهاد می‌نماییم که علاوه بر این نوع عصاره (هیدروالکلی) اثرات عصاره‌های تام دیگر (آبی- استونی- اتیل استاتی و....) بر روی رده‌های سلولی سرطانی نیز مورد بررسی قرار گیرند و هم چنین مواد مؤثره اعضای مختلف این گیاه (برگ- گل- میوه- دانه و...) را جداسازی نموده و سپس اثرات آن‌ها بر مهار رشد رده‌های سلولی سرطانی مختلف نیز ارزیابی گردد و در پایان مکانیسم‌های مختلف مهار رشد را مورد بررسی قرار دهیم.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه خانم عاطفه پرورش دانشجوی دکترای داروسازی می‌باشد.

References

1. Dorsley k. Encyclopedia of Medicinal plants. 1st ed. London:CRC press; 1996.
2. Mozaffarian v. Farhang namhaye giyahan iran.5th ed. Tehran: Ghadyani press. 1386 (persian).
3. Tyagi N, Sharma G, Hooda, V, Phytochemical and pharmacological profile of *lagenaria siceraria*. International research journal of pharmacy (2012); 3:1-4.
4. Shah b, seth a. pharmacognostic studies of the *lagenaria siceraria* (molina) standley. international journal of pharmtech research. (2010),2,121-124.
5. Dhiman k, Gupta a, Sharma d. k,Gill,n.s, Goyal a,a review on the medicinally important plants of the family cucurbitaceae. Asian journal of clinical nutrition (2012), 4,16-26.
6. Kubde m, khadabadis. farooqui,i.a.,deore,s.l. *Lagenariasiceraria*: phytochemistry, pharmacognosy and pharmacological studies.report and opinion (2010),2,91-98.
7. Sankari m. chitra v. jubilee r. silambu p. raju d. Immunosuppressive activity of aqueous extract of Lagenaria siceraria in mice. scholars research library (2010),2,291-296.
8. Ghosh k, chandra,k, ojha a, sarkar s, islam s. Structural identification and cytotoxic activity of a polysaccharide from the fruits of Lagenaria siceraria. Carbohydrate research. (2009), 344,693-698.
9. p, kundu s, bala a, mazumder u k, halder p k. Evaluation of anticancer activity of *Lagenaria siceraria* aerial parts. International journal of cancer research (2011), 244-253.
10. Deshpande j, choudhari a, mishra M.R, meghre v.s, wadodkar s.g, dorle a.k. Beneficial effects of *Lagenaria siceraria* fruit epicarp in animal models. Indian journal of experimental biology (2008); 46: 234-242.
11. Mongelli E. Cytotoxic and DNA interaction activity of extracts from medicinal plants used in Agrentina. Journal of Ethnopharmacology (2000); 71: 145-157.
12. Miller, M. Basic Chemical Information of cisplatin. Available at: http://www.chm. bris.ac.uk/motm/cisplatin/htmlonly. Accessed June 14,2012,(2008).
13. Anonymus, Cisplatin is the Penicillin of Cancer. Available at: http://www.cisplatin. org. Accessed Aug 2,2012 ,(2011).
14. Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Naderi H, Saeedi Saravi SS, Comparison of the cytotoxic effects of Juniperus sabina and Zataria multiflora extracts with Taxus baccata extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines, Pharmacognosy Magazine (2010);6 (22):102-106