

Synthesis And Characterization of Polymeric Magnetic Nanocomposites Containing Myricetin, And Evaluation of Their Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Effects in HCT116 Colorectal Cancer Cells |

Mehrnoosh Moti¹, Mina Ramezani^{2*}, Nastaran Asgarimoghadam², Homayon Ahmadpanahi³

1- Department of Biology, SR. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, CT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of Chemistry, CT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Mina Ramezani, Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: mina.ramezani@iau.ac.ir

| Received | 2026/07/16

| Revised | 2026/06/26

| Accepted | 2026/04/04

| Abstract |

Background and Aim: Colorectal cancer is one of the most common malignancies worldwide, and the development of new therapeutic strategies using natural compounds and advanced drug delivery systems has attracted considerable attention. Myricetin, a polyphenolic flavonoid, has several biological activities, including anticancer effects; however, its poor aqueous solubility and limited bioavailability have hindered its therapeutic use. This study aimed to synthesize polymeric magnetic nanoparticles for drug delivery and to evaluate the biological effects of myricetin-loaded nanoparticles on HCT116 colorectal cancer cells.

Materials and Methods: Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were synthesized by co-precipitation, surface-modified via polymer grafting, and then loaded with myricetin. The physicochemical properties of the nanoparticles were examined using XRD, FE-SEM, VSM, and DLS. Drug release was also evaluated using the dialysis bag method. The cytotoxic effects of myricetin nanoparticles on HCT116 cells were assessed by the MTT assay, and apoptosis induction was evaluated by Annexin V-FITC/PI flow cytometry.

Results: Characterization results confirmed the successful formation of magnetic nanoparticles and efficient myricetin loading. Based on DLS analysis, the main distribution peak was around 95 nm, with a PDI of 0.95. Drug release studies showed that the myricetin nanoparticles had a controlled release profile and an appropriate release behavior for inhibiting cancer cells. The MTT results showed that the myricetin nanoparticles reduced HCT116 cell viability in a dose-dependent manner, with an IC₅₀ of 37.5 µg/m. Flow cytometry also showed that treatment with myricetin nanoparticles significantly increased cellular apoptosis compared with the control group.

Conclusion: Findings of this study indicate that polymeric magnetic nanoparticles can serve as a suitable system for delivering myricetin and enhancing its cytotoxic and apoptotic effects in colorectal cancer cells. This nanocarrier may be a promising approach for the development of nanodrug delivery-based cancer therapies.

| Keywords |

Myricetin |
Polymeric Magnetic |
Nanoparticles |
Nano drug Delivery |
Apoptosis |
HCT116 Cells |
Colorectal Cancer |

| Iau Science |

سنتز و مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت‌های پلیمری مغناطیسی حاوی مایریستین و ارزیابی اثرهای سایتوتوکسیک و القای آپوپتوز آن در سلول‌های سرطان کولورکتال HCT116

مهرنوش مطیع^۱، مینا رمضانی^{۲*}، نسترن اصغری مقدم^۲، همایون احمد پناهی^۳

۱- دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه شیمی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مینا رمضانی، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ پست الکترونیکی: mina.ramezani@iau.ac.ir

| تاریخ دریافت | ۱۴۰۵/۰۱/۱۵ | | تاریخ ویرایش | ۱۴۰۵/۰۴/۰۵ | | تاریخ پذیرش | ۱۴۰۵/۰۴/۲۵ |

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در جهان است. همچنین مایریستین به‌عنوان یک فلاونوئید پلی‌فنولی دارای فعالیت‌های زیستی متعددی از جمله اثرهای ضدسرطانی است، با این حال حلالیت پایین در آب و فراهمی زیستی محدود، کاربرد درمانی آن را با چالش مواجه کرده است. هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات مغناطیسی پلیمری به‌عنوان حامل دارویی و بررسی اثرهای زیستی نانوذرة مایریستین بر سلول‌های سرطان کولورکتال HCT116 است.

مواد و روش‌ها: نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 به‌روش هم‌رسوبی سنتز و سپس با گرافیتینگ پلیمری اصلاح سطحی شدند و مایریستین بر روی آن‌ها بارگذاری گردید. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات با استفاده از آزمون‌های XRD، FESEM، VSM و DLS مشخصه‌یابی شد. همچنین رهائش دارو با استفاده از روش کیسه دیالیزی ارزیابی شد. اثرهای سایتوتوکسیک نانومایریستین بر سلول‌های HCT116 با آزمون MTT و القای آپوپتوز با استفاده از فلو سائتومتري Annexin V-FITC/PI بررسی گردید.

نتایج: نتایج مشخصه‌یابی، تشکیل موفق نانوذرات مغناطیسی و بارگذاری مؤثر مایریستین را تأیید نمود. براساس آنالیز DLS پیک اصلی توزیع در حدود ۹۵ نانومتر قرار داشت و مقدار $PDI = 0.95$ به دست آمد. مطالعه رهائش دارو نشان داد که پروفایل رهائش در ۶ ساعت نخست، یک الگوی دو فازی کلاسیک را نشان داد که رهائش به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر pH و دما قرار داشت و یک رهائش کنترل‌شده را نشان داد. نتایج آزمون MTT نیز نشان داد که نانومایریستین به‌صورت وابسته به دوز، موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های HCT116 شد و مقدار IC_{50} آن $37/5 \mu g/mL$ تعیین گردید. همچنین نتایج فلو سائتومتري نشان داد که تیمار با نانومایریستین باعث افزایش معنی‌دار آپوپتوز سلولی در مقایسه با گروه کنترل شد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات مغناطیسی پلیمری می‌توانند به‌عنوان یک سامانه مناسب برای انتقال مایریستین عمل کرده و اثرهای سایتوتوکسیک و آپوپتوزی آن را در سلول‌های سرطان کولورکتال تقویت کنند. این نانوسامانه می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد امیدبخش در توسعه راهکارهای مبتنی بر نانودارورسانی برای درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی

مایریستین |
نانوذرات مغناطیسی پلیمری |
نانودارورسانی |
آپوپتوز |
سلول HCT116 |
سرطان کولورکتال |

| علوم Iau |

سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های دستگاه گوارش و از علل مهم مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان در سراسر جهان به‌شمار می‌رود. با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در روش‌های درمانی از جمله شیمی‌درمانی و درمان‌های هدفمند، اثربخشی بسیاری از داروهای ضدسرطان به‌دلیل بروز مقاومت دارویی، سمیت سیستمیک و عدم اختصاصیت کافی نسبت به سلول‌های سرطانی محدود است. از این‌رو، توسعه راهبردهای درمانی نوین مبتنی بر ترکیب‌های زیست‌فعال طبیعی و سامانه‌های دارورسانی پیشرفته مورد توجه گسترده قرار گرفته است (۱).

در میان ترکیب‌های طبیعی با پتانسیل درمانی، مایریستین^۱ یک فلاونوئید پلی‌فنولی است که به‌طور گسترده در چای، انواع توت‌ها، انگور و برخی گیاهان دارویی یافت می‌شود و دارای فعالیت‌های زیستی متعددی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی است (۲ و ۳).

مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که مایریستین قادر است با مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، القای آپوپتوز و تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با رشد تومور مانند MAPK، NF-κB و PI3K/Akt نقش مهمی در مهار پیشرفت سرطان ایفا کند (۴ و ۵). همچنین گزارش شده است که این ترکیب می‌تواند از طریق افزایش استرس اکسیداتیو در سلول‌های توموری و فعال‌سازی مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی‌شده، رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند (۶).

با وجود این مزایا، کاربرد زیستی مایریستین به‌دلیل حلالیت پایین در آب، فراهمی زیستی محدود و متابولیسم سریع با چالش‌هایی مواجه است که می‌تواند اثربخشی درمانی آن را کاهش دهد (۷). در سال‌های اخیر، استفاده از فناوری نانو به‌عنوان راهبردی مؤثر برای بهبود ویژگی‌های فارماکوکینتیکی ترکیب‌های کم‌محلول مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات پلیمری به‌دلیل اندازه کوچک، سطح ویژه بالا، قابلیت اصلاح سطح و امکان بارگذاری مؤثر دارو می‌توانند پایداری دارو را افزایش داده و انتقال آن به سلول‌های هدف را تسهیل کنند (۸ و ۹). به‌علاوه، این سامانه‌ها قادرند با افزایش جذب سلولی و فراهم کردن رهایش کنترل‌شده دارو، اثربخشی ترکیب‌های ضدسرطان را افزایش دهند (۱۰).

برای ارزیابی اثرهای ضدسرطانی ترکیب‌های جدید، بررسی زنده‌مانی سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده از شاخص‌های مهم محسوب می‌شوند. آزمون MTT یکی از روش‌های متداول برای تعیین اثرهای سایتوتوکسیک ترکیب‌ها بر سلول‌های سرطانی است، درحالی‌که فلوسایتومتری با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/Propidium iodide (PI) امکان تمایز دقیق بین سلول‌های زنده، سلول‌های در آپوپتوز اولیه و آپوپتوز پایانی یا نکروز را فراهم می‌کند و به‌طور گسترده برای مطالعه مکانیسم‌های مرگ سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. براین‌اساس، هدف از پژوهش حاضر سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات پلیمری مغناطیسی حاوی مایریستین و بررسی اثرهای سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک آن‌ها بر سلول‌های سرطان کولورکتال HCT116 است.

۲ | مواد و روش‌ها

۲-۱ | تهیه نانوذره حاوی مایریستین

در مرحله نخست، حدود ۲ گرم نانوذره مغناطیسی اکسید آهن (Fe_3O_4) به‌عنوان هسته اصلی به‌روش هم‌رسوبی سنتز شد. بدین منظور، مقدار $4/8$ گرم $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ و $1/8$ گرم $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ در 100 میلی‌لیتر آب دیونیزه و تحت اتمسفر نیتروژن حل شدند. محلول حاصل به‌مدت حدود ۱۵ دقیقه با سرعت 500 دور بر دقیقه هم‌زده شد (IKA Stirrer) تا انحلال کامل پیش‌ماده‌ها انجام گیرد. سپس، 10 میلی‌لیتر آمونیاک 28 درصد (NH_4OH) (Sigma-Aldrich) به‌صورت ناگهانی به‌محلول افزوده شد که بلافاصله منجر به تشکیل رسوب سیاه‌رنگ گردید. سوسپانسیون حاصل به‌مدت 1 ساعت دیگر تحت هم‌زدن قرار گرفت تا فرایند تشکیل نانوذرات تکمیل شود. در ادامه، رسوب مغناطیسی با استفاده از آهنربای خارجی جدا شد و چندین بار با آب مقطر و اتانول شست‌وشو داده شد تا ناخالصی‌های باقی‌مانده حذف گردند. در نهایت نمونه در آون خلأ (Binder, Germany) در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب خشک شد. در مرحله بعد، به‌منظور اصلاح سطح نانوذرات، مقدار $2/5$ میلی‌لیتر مرکاپتوپروپیل‌تری‌متوکسی‌سیلان در $5/47$ میلی‌لیتر تولوئن خشک حل گردید. سپس 2 گرم از نانوذرات

¹ Myricetin

همچنین اندازه هیدرودینامیک، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه DLS (Horiba, Japan) اندازه‌گیری و سپس تست رهایش آن توسط کیسه دیالیز بررسی شد.

۳-۲ | بارگذاری مایریستین

مایریستین (Merck Company, 1008503180) به میزان ppm ۱۰۰ به سوسپانسیون نانوذرات اضافه و هم‌زده شد تا بارگذاری انجام شود.

۴-۲ | بررسی رهایش دارو به‌روش کیسه دیالیز

به‌منظور بررسی پروفایل رهایش دارو، از روش کیسه دیالیز استفاده شد. ابتدا ۲ میلی‌لیتر از فرمولاسیون حاوی دارو (نانوذره) داخل کیسه دیالیز با وزن مولکولی برش مناسب قرار داده شد و دو سر کیسه به‌طور کامل بسته شدند تا از نشت نمونه جلوگیری گردد. سپس کیسه دیالیز درون حجم ۵۰ میلی‌لیتر محیط رهایش شامل بافر فسفات‌سالین (PBS) با pHهای ۷/۴ و ۵/۶ قرار داده شد تا شرایط فیزیولوژیک و محیط اسیدی شبیه‌سازی شود.

آزمایش رهایش در دماهای ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سیستم در طول آزمایش تحت هم‌زدن ملایم قرار گرفت تا شرایط یکنواخت حفظ شود. در زمان‌های مشخص (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ دقیقه)، حجم ثابتی از محیط رهایش خارج و بلافاصله با همان حجم از بافر تازه جایگزین شد تا شرایط یکنواختی برقرار بماند.

جذب نوری نمونه‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (Elisa Reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت دارو (میکروگرم بر لیتر) براساس منحنی استاندارد محاسبه گردید. درصد رهایش جمع‌ی دارو در هر زمان با در نظر گرفتن حجم برداشت‌شده و جایگزینی محیط محاسبه و گزارش شد. تمامی آزمایش‌ها برای بررسی اثر pH، دما و زمان بر رفتار رهایش دارو انجام گرفت.

۵-۲ | کشت و تکثیر سلول‌ها

سلول‌های HCT116 (سرطان کولورکتال انسانی) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند و در محیط DMEM با گلوکز بالا (۴/۵ گرم در لیتر) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اتمسفر ۵

مغناطیسی سنتز شده به‌محلولا بالا افزوده شد و مخلوط واکنش تحت شرایط رفلکس در دمای ۹۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت و تحت هم‌زدن مداوم قرار گرفت. پس از اتمام واکنش، نانوذرات با ۲۰ میلی‌لیتر تولوئن شست‌وشو داده شدند تا مواد واکنش‌نداده حذف شوند. در نهایت، نمونه در دمای ۴۹ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حلال به‌طور کامل تبخیر و نانوذرات خشک شوند. در مرحله بعد نیز فرایند گرافتینگ پلیمری بر سطح نانوذرات انجام شد. بدین منظور، محلولی شامل ۴۰ میلی‌لیتر اتانول، ۸ میلی‌لیتر مونومر N-وینیل‌کاپرولاکتام ۱۰ میلی‌لیتر آلایل‌گلیسیدین‌اتر تهیه گردید. به‌منظور حذف اکسیژن محلول و ایجاد محیط بی‌اثر، مخلوط واکنش به‌مدت حداقل ۷ ساعت تحت جریان گاز نیتروژن قرار گرفت. سپس حدود ۰/۱ گرم آزوبی‌ایزوبوتیرونیتریل (AIBN) به عنوان آغازگر رادیکالی به سیستم افزوده شد. واکنش پلیمریزاسیون تا تشکیل کامل پلیمر ادامه یافت. پس از پایان واکنش، نانوذرات گرافت‌شده با ۲۰ میلی‌لیتر اتانول شست‌وشو داده شدند تا مونومرهای باقی‌مانده و ناخالصی‌ها حذف گردند. در مرحله نهایی، جهت عاملی‌سازی سطح با هیالورونیک‌اسید، مقدار ۰/۵ گرم هیالورونیک‌اسید در ۳۰ میلی‌لیتر بافر استات حل گردید و سپس ۳۰ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به آن افزوده شد تا انحلال کامل صورت گیرد. پس از تهیه محلول یکنواخت، ۱ گرم از نانوذرات مغناطیسی گرافت‌شده به‌محلولا اضافه شد و مخلوط به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق تحت هم‌زدن ملایم نگهداری شد تا فرایند اتصال سطحی انجام شود. پس از تکمیل واکنش، نانوذرات به‌ترتیب با ۲۰ میلی‌لیتر بافر استات و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر شست‌وشو داده شدند تا ترکیب‌های متصل‌نشده حذف گردند. در ادامه نمونه به‌مدت ۲ تا ۳ روز در آب مقطر در دمای اتاق نگهداری شد تا خالص‌سازی نهایی انجام گیرد. در پایان نیز نانوذرات در دمای محیط خشک شدند.

۲-۲ | مشخصه‌یابی نانوذرات

پراش پرتوی ایکس (XRD) (Rigaku Ultima IV, Japan) برای تعیین ساختار بلوری و فاز نانوذرات با استفاده از تابش Cu K α ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) انجام شد و الگوها با داده‌های استاندارد JCPDS مقایسه گردیدند. مورفولوژی و ساختار سطحی نانوذرات توسط FE-SEM (Tescan, Mira, Czech Republic) بررسی شد.

درصد CO₂ و رطوبت مناسب انکوبه شده و محیط کشت هر سه روز یکبار تعویض شد تا سلول‌ها به تراکم مطلوب برسند.

۲-۶ | آماده‌سازی سلول‌ها برای آزمون MTT

برای آماده‌سازی آزمون MTT، سلول‌ها پس از شست‌وشو با PBS توسط تریپسین از فلاسک جدا و سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در محیط کشت مجدداً سوسپانسه گردید. جهت شمارش، بخشی از سوسپانسیون با رنگ تریپان‌بلو مخلوط شد و پس از همگن‌سازی، بر روی لام نئوبار منتقل شد تا سلول‌های زنده شمارش شوند. براساس فرمول زیر نیز تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر محاسبه شد:

$$\frac{\text{Total cells in 4 squares}}{4} \times (\text{Dilution factor}) \times 10^4 = \text{Cell count (cells/mL)}$$

با توجه به ضریب رقت ۱:۱۰، مقدار فاکتور رقت برابر ۱۰ در نظر گرفته شد. براساس نتایج شمارش، سلول‌ها با تراکم مناسب برای انجام تیمارها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای نیز بارگذاری شدند.

۲-۷ | آزمون MTT (MTT Cell Viability Assay)

برای ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها، آزمون MTT انجام شد. سلول‌های HCT116 با تراکم ۱۰,۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده و با غلظت‌های مختلف نانودارو (۵/۱۲، ۲۵، ۳۷/۵، ۵۰ و ۶۲/۵ میکروگرم بر لیتر) تیمار شدند. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO₂، محلول MTT افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۳-۴ ساعت انکوبه شدند تا کریستال‌های فورمازان تشکیل شوند. سپس محیط کشت تخلیه شده و DMSO برای حل کردن کریستال‌ها اضافه گردید. در نهایت، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و زنده‌مانی سلول‌ها با مقایسه گروه‌های تیمار و کنترل تعیین گردیدند. درصد بقای سلولی نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times (\text{Atreated} / \text{Acontrol})$$

۲-۸ | بررسی آپتوز

برای بررسی آپتوز، حدود ۱×۱۰^۵ سلول در میکروتیوب حاوی ۵۰۰ μL بافر اتصال (IX Binding Buffer) سوسپانسه شدند و یک نمونه بدون رنگ به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

سپس ۵ μL Annexin V-FITC به نمونه‌ها افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه گردید. پس از آن، سلول‌ها با ۱ mL بافر اتصال شسته شده و در ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت رسوب سلولی در ۵۰۰ μL بافر مجدداً سوسپانسه شد. سپس ۳ μL پروپیدومیدید اضافه شد و نمونه‌ها با دستگاه فلو‌سایتومتری BD (FACSCalibur, BD Bioscience) آنالیز شدند. داده‌ها با نرم‌افزار (BD FACSuite™) FlowJo کمی شدند.

۲-۹ | روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

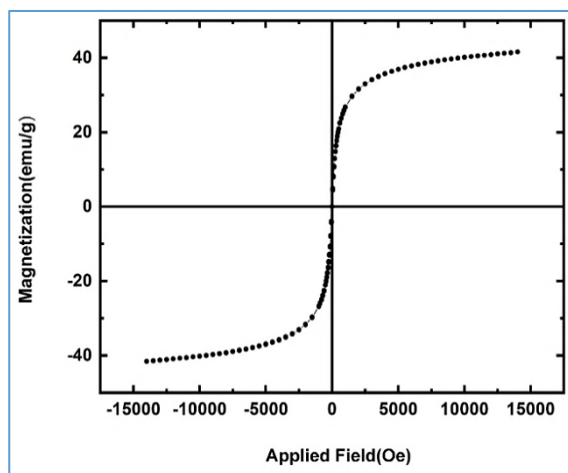
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. آزمون‌های آماری شامل T-test جفت‌نشده و آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. سطح معناداری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

۳ | نتایج

۳-۱ | ارزیابی نانوذره (پراش اشعه ایکس)

پراش اشعه ایکس برای بررسی ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). در این الگو، نانوذرات Fe₃O₄ با رنگ مشکی و نانوذرات Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ با رنگ قرمز نمایش داده شده‌اند. در نمونه Fe₃O₄ پیک‌های مشخص در زوایای تقریباً ۳۰/۱، ۳۵/۴، ۴۳/۱، ۵۳/۴، ۵۶/۹ و ۶۲/۵ درجه مشاهده شدند که به صفحات بلوری (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) نسبت داده می‌شوند و با ساختار اسپینل معکوس Fe₃O₄ مطابقت دارند. پس از پوشش‌دهی سطح نانوذرات، همین پیک‌ها در موقعیت‌های مشابه مشاهده شدند و هیچ‌گونه جابه‌جایی در مکان پیک‌ها دیده نشد که نشان‌دهنده حفظ ساختار کریستالی هسته Fe₃O₄ است. با این حال، کاهش نسبی در شدت پیک‌ها در نمونه پوشش‌دار مشاهده شد که می‌تواند ناشی از حضور لایه پوششی روی سطح نانوذرات باشد.

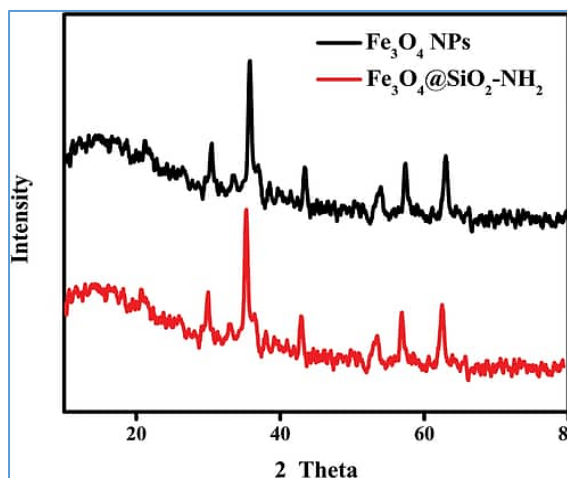
پاسخ‌دهی بالای نانوذرات به میدان خارجی است. همچنین مقادیر زورمغناطیس (H_c) و مغناطیس پسماند (M_r) تقریباً صفر بودند که تأیید می‌کنند نانوذرات پس از حذف میدان، پراکندگی مغناطیسی دائمی از خود باقی نمی‌گذارند و رفتار کاملاً مغناطیس‌نرم از خود بروز می‌دهند. چنین ویژگی‌هایی با توجه به اندازه نانومتري و ساختار کریستالی نمونه از شاخصه‌های اصلی نانوذرات اکسید آهن با رفتار سوپرپارامغناطیسی بوده و این موضوع قابلیت کاربرد آن‌ها را در سامانه‌های زیست‌پزشکی از جمله جداسازی مغناطیسی، دارورسانی و هیپرترمی حرارتی تقویت می‌کند.



شکل ۲- منحنی مغناطیس وابسته به میدان نانوذرات Fe_3O_4 و تأیید رفتار سوپرپارامغناطیسی

(PDI) برابر با ۰/۹۵ گزارش شد. مقدار بالای PDI و اختلاف قابل توجه بین اندازه پیک اصلی و Z-average نشان‌دهنده توزیع گسترده اندازه ذرات و وجود تجمع‌ها در سوسپانسیون نانوذرات است. این پدیده در نانوذرات مغناطیسی مبتنی بر Fe_3O_4 به دلیل برهم‌کنش‌های مغناطیسی بین هسته‌ها و تمایل ذاتی آن‌ها به آگلومراسیون در محیط مایع پدیده‌ای رایج محسوب می‌شود. بنابراین اندازه حدود ۹۵ نانومتر را می‌توان به عنوان اندازه غالب ذرات در توزیع شدت در نظر گرفت، درحالی‌که افزایش مقدار Z-average احتمالاً ناشی از حضور تجمع‌های بزرگ‌تر در سوسپانسیون است که به‌طور قابل‌توجهی بر میانگین هیدرودینامیکی اندازه‌گیری شده در آنالیز DLS تأثیر می‌گذارند.

۲-۳ ویژگی‌های مغناطیسی نانوذرات سنتز شده با استفاده از آنالیز مغناطیس‌سنجی نمونه ارتعاشی^۲ (VSM) بررسی خواص مغناطیسی نانوذرات سنتز شده با استفاده از آزمون VSM (MDKB) منحنی هیستریزس مشخصی را در بازه میدان مغناطیسی $15000 \pm Oe$ نشان داد (شکل ۲). منحنی به دست آمده دارای شکل S و فاقد حلقه هیستریزس قابل توجه بود که این رفتار بیانگر وجود خاصیت سوپرپارامغناطیسی در نمونه است. مقدار مغناطیس اشباع (M_s) تقریباً 63 emu/g اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده قدرت



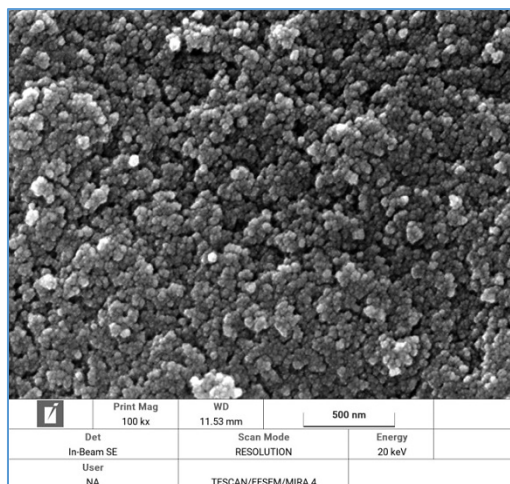
شکل ۱- الگوی پراش پرتوی ایکس (XRD) برای بررسی ساختار کریستالی نانوذره

۳-۳ بررسی مورفولوژی نانوذرات با استفاده از FE-SEM و براساس آنالیز^۳ (DLS)

برای بررسی مورفولوژیکی ذرات از آزمون FE-SEM (Tescan Mira) و جهت بررسی اندازه هیدرودینامیکی و توزیع اندازه نانوذرات از آنالیز پراکندگی نور پویا (DLS) (Horbia) استفاده شد (شکل ۳). نتایج نشان دادند که مورفولوژی ذرات کروی و پیک غالب توزیع اندازه ذرات در حدود ۹۵ نانومتر قرار دارد که بیانگر حضور جمعیت اصلی نانوذرات در این محدوده اندازه است. باین حال، مقدار میانگین هیدرودینامیکی به دست آمده از تحلیل کومولانت (Z-average) برابر با ۴۲۲ نانومتر و شاخص پراکندگی

³ Dynamic Light Scattering

² Vibrating Sample Magnetometer

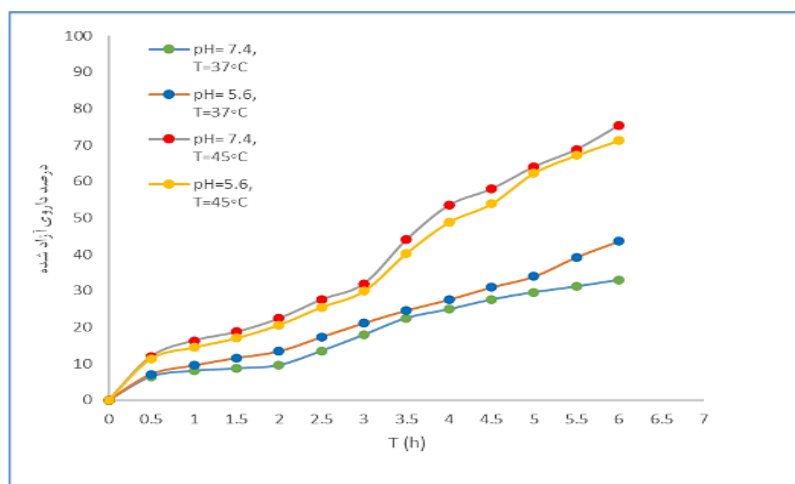


شکل ۳- بررسی مورفولوژی و نمای سطحی نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با سیلیکای آمین دار توسط آنالیز FE-SEM با بزرگنمایی ۵۰۰ نانومتر

۳-۴ | ارزیابی پروفایل رهایش دارو در pH و دمای متفاوت

رفتار رهایش درون کشتگاهی دارو از سامانه نانوفرموله شده تحت شرایط مختلف فیزیولوژیک و تنشی ($pH=7/4$ در $pH=37$ درجه سانتی گراد، $pH=5/6$ (به عنوان pH سلول های سرطانی) در 37 درجه سانتی گراد و $pH=7/4$ در 45 درجه سانتی گراد) مورد بررسی قرار گرفت تا پاسخ پذیری حامل نسبت به تغییرهای محیطی ارزیابی شود. پروفایل رهایش در ۶ ساعت نخست، یک الگوی دو فازی کلاسیک را نشان داد که شامل یک مرحله آزادسازی سریع اولیه و به دنبال آن روند رهایش تدریجی تر بود. این رهایش انفجاری اولیه معمولاً به انتشار مولکول های دارویی نسبتاً جذب شده یا به دام افتاده در سطح نانوذرات نسبت داده می شود. همچنین قابل توجه است که میزان رهایش در این فاز اولیه به طور

قابل ملاحظه ای تحت تأثیر pH و دما قرار داشت. در شرایط فیزیولوژیک ($pH=7/4$ و 37 درجه سانتی گراد) رهایش تجمعی نسبتاً پایین باقی ماند که نشان دهنده پایداری ساختاری مناسب نانوحامل در محیط های طبیعی زیستی است. در مقابل، قرارگیری در شرایط اسیدی ملایم ($pH=5/6$ ، 37 درجه سانتی گراد) منجر به افزایش قابل توجه نرخ رهایش در همان بازه زمانی شد (شکل ۴). افزایش رهایش در محیط اسیدی نشان دهنده ناپایداری نسبی، تورم یا افزایش نفوذپذیری ماتریکس پلیمری در pH پایین تر است. علاوه بر این، افزایش دما به 45 درجه سانتی گراد در $pH=7/4$ و $pH=5/6$ موجب تسریع چشمگیر فرایند رهایش دارو شد. از آنجاکه مونومر استفاده شده نسبت به دما حساس می باشد، در دمای بالاتر دچار انقباض و چروکیدگی خواهد شد بنابراین این امر منجر به رهایش بیشتر دارو می گردد.

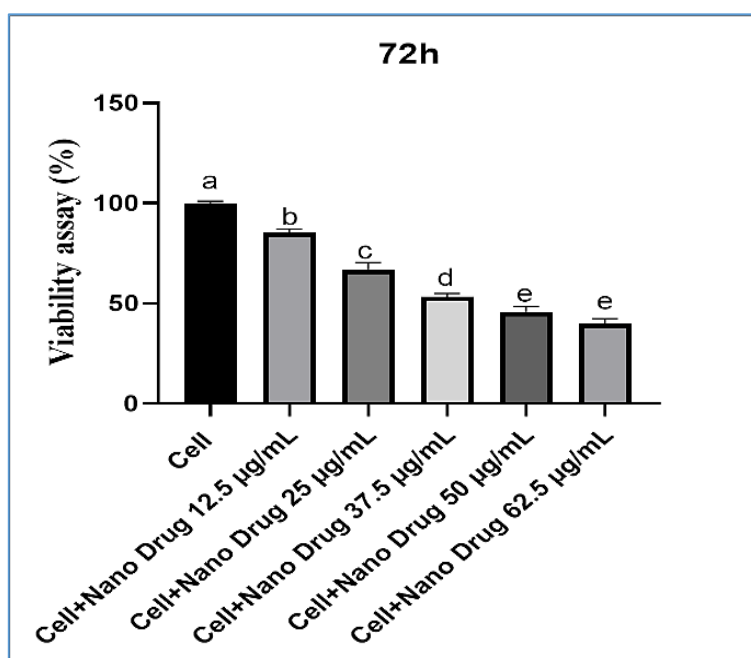


شکل ۴- رفتار رهایش کنترل شده و وابسته به pH و دما از نانوفرمولاسیون در بازه زمانی ۶ ساعت

۳-۵ | آزمون زنده‌مانی سلولی^۴

در آزمون MTT، میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف از نانومایریستین مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، گروه کنترل دارای بالاترین میزان زنده‌مانی سلولی (حدود ۱۰۰ درصد) است که نشان‌دهنده وضعیت طبیعی و سالم سلول‌ها در غیاب هرگونه عامل سمی یا دارویی می‌باشد. با افزایش غلظت نانومایریستین از ۱۲/۵ $\mu\text{g/mL}$ تا ۶۲/۵ $\mu\text{g/mL}$ ، کاهش تدریجی و

معنی‌دار ($p < 0.001$) در درصد زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده شد. این کاهش وابسته به دوز، بیانگر آن است که نانومایریستین در غلظت‌های بالاتر می‌تواند اثرهای سیتوتوکسیک بر سلول‌ها اعمال نماید. در غلظت پایین (۱۲/۵ $\mu\text{g/mL}$) میزان زنده‌مانی هنوز بالاتر از ۸۵ درصد باقی مانده است اما در غلظت‌های بالاتر (۵۰ $\mu\text{g/mL}$ و ۶۲/۵ $\mu\text{g/mL}$)، میزان زنده‌مانی به حدود ۵۰ درصد کاهش یافت و همچنین میزان IC_{50} حدود $\mu\text{g/mL}$ ۳۷/۵ به دست آمد (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین دوزهای مختلف نانومایریستین بر میزان زنده‌مانی سلولی (ستون‌های دارای حروف متفاوت دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند).

^۴ Cell Viability

۳-۶ | بررسی آپوپتوز سلولی با استفاده از فلوسایتومتری

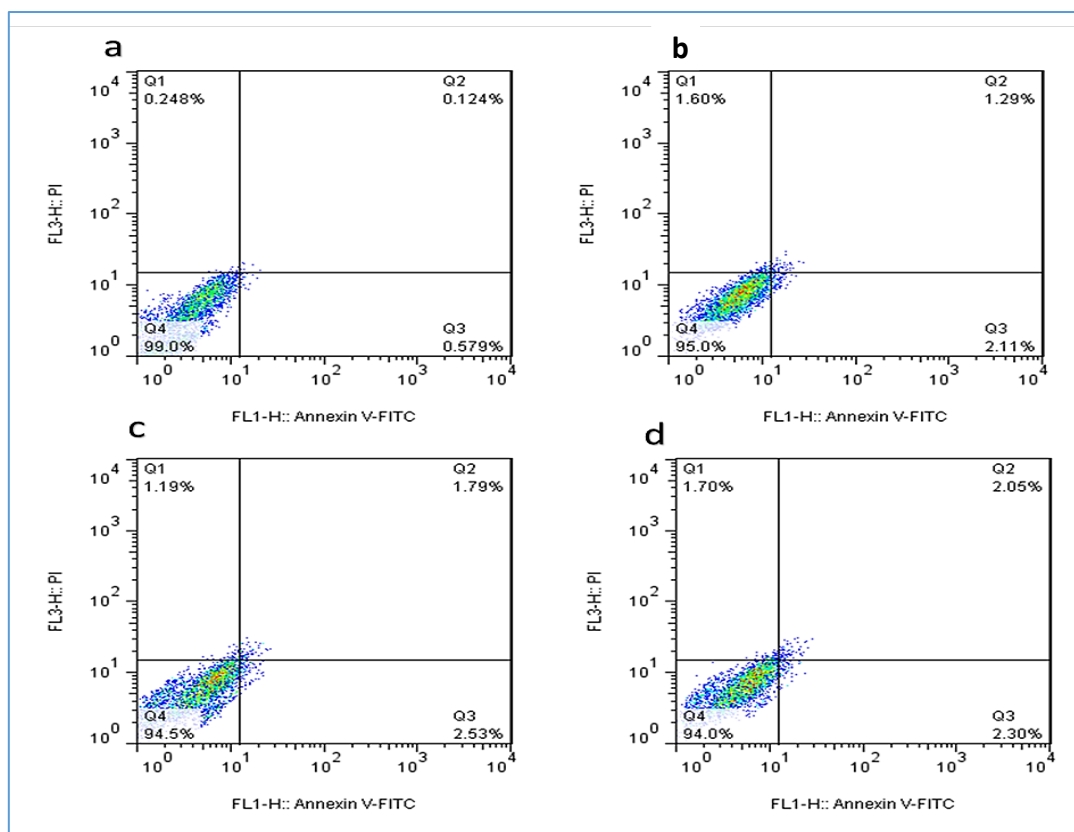
(Annexin V-FITC/PI) در سلول‌های HCT116

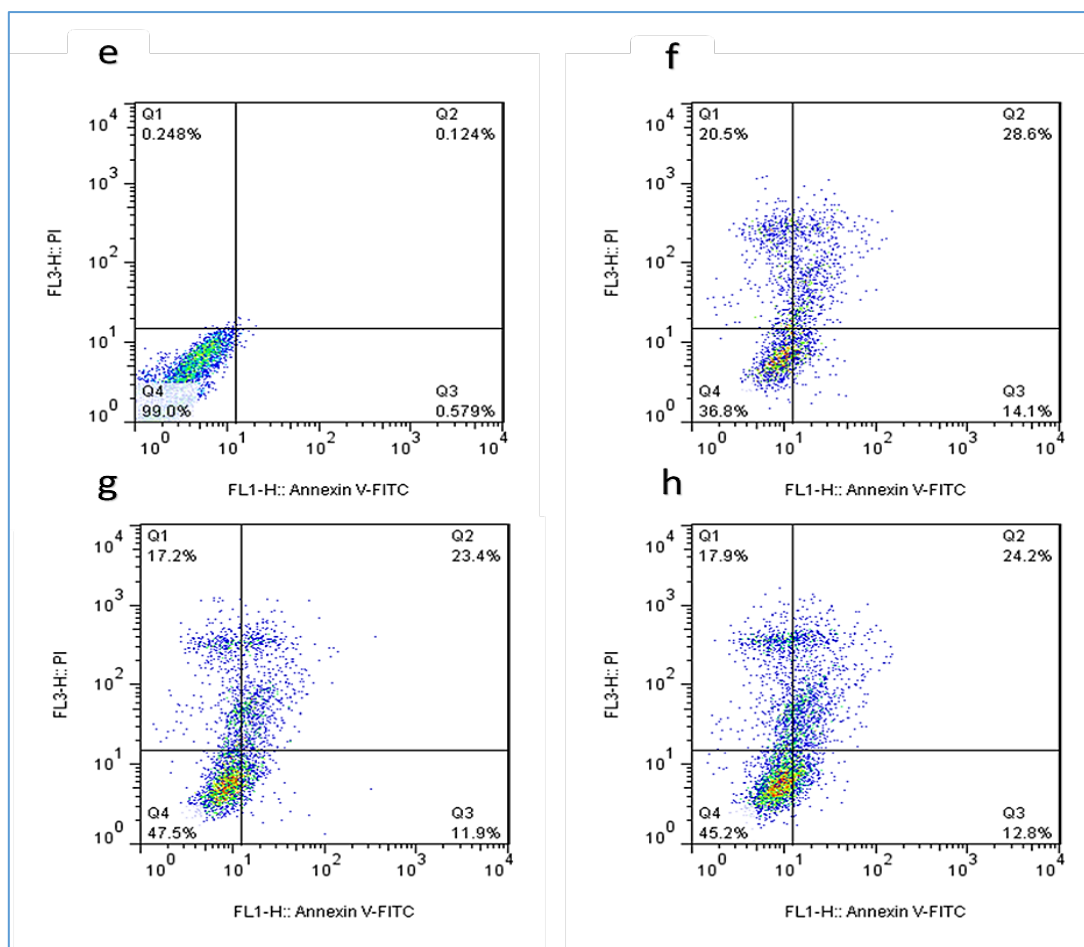
نمودارهای فلوسایتومتری Annexin V-FITC / PI ارائه شده مقایسه روشنی از وضعیت بقا و مرگ سلولی در سلول‌های HCT116 کنترل و تیمار شده با «نانو-مایرستین» را نشان می‌دهند (شکل a-h). در نمونه‌های کنترل ۹۹ درصد جمعیت در کوادرانت Annexin⁻/PI⁻ قرار دارند که نشان‌دهنده سلول‌های زنده و غیرآپوپتوتیک است، در حالی که جمعیت‌های Annexin⁺/PI⁻ (آپوپتوز اولیه) و Annexin⁺/PI⁺ (آپوپتوز ثانویه/پایانی یا مرگ برنامه‌ریزی شده همراه با نفوذپذیری غشا) هریک تنها در حدود $2/5-0/5$ درصد مشاهده می‌شوند؛

پس از تیمار با نانو-مایرستین، الگو به‌طور مشخص جابه‌جا می‌شود: درصد سلول‌های زنده (Annexin⁻/PI⁻) به حدود ۴۷ درصد کاهش می‌یابد و در عوض جمعیت‌های Annexin⁺/PI⁻ (آپوپتوز اولیه $\approx 12-14$ درصد) و Annexin⁺/PI⁺ (آپوپتوز پایانی $\approx 23-29$ درصد) به‌طور چشمگیری افزایش نشان می‌دهند؛ همچنین بخش قابل توجهی از سلول‌ها در کوادرانت Annexin⁻/PI⁺ (نکروز یا نکروز ثانویه، حدود ۱۷-۲۰ درصد در برخی تکرارها) تجمع یافته‌اند. این تغییرهای معنی‌دار نشان می‌دهند که نانو-دارو به‌طور مؤثری سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده در جمعیت HCT116 شده است و سهم قابل توجهی از سلول‌ها مسیر آپوپتوتیک را طی کرده و به مراحل پایانی آپوپتوز و یا نکروز ثانویه رسیده‌اند (جدول ۱).

جدول ۱- درصد آپوپتوز در دو گروه کنترل و نانودارو

گروه	سلول‌های زنده (%)	آپوپتوز اولیه (%)	آپوپتوز انتهایی (%)	نکروز (%)
کنترل	۹۹-۹۴	کمتر از ۱	کمتر از ۱	کمتر از ۱
نانودارو + HCT116	۴۷-۳۶	۱۴-۱۲	۲۹-۲۳	۲۰-۱۷





شکل ۶- اثر نانوذره مایرستین بر القای آپوپتوز در سلول‌های HCT116 با استفاده از فلوسایتومتری Annexin V-

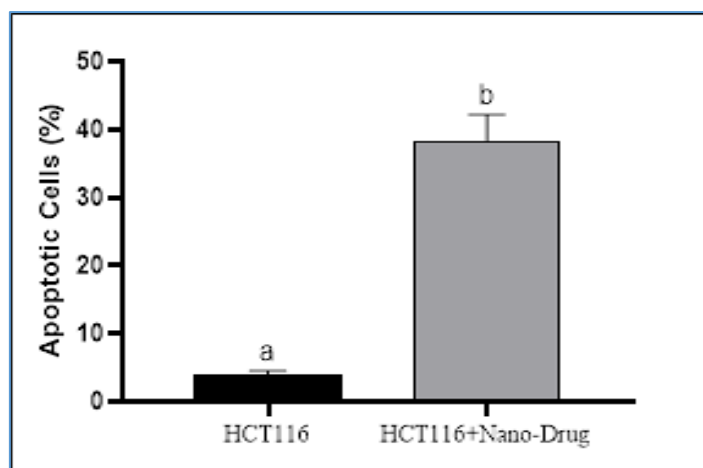
FITC/PI (a) گروه کنترل نانوذره خالی با غلظت ۱۲/۵، b گروه کنترل نانوذره خالی با غلظت ۲۵، c گروه کنترل نانو ذره خالی با غلظت ۳۷/۵ و d گروه کنترل نانوذره خالی با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر (e تا h). e به همراه نانو ذره مایرستین با غلظت ۱۲/۵، f همراه نانو ذره مایرستین با غلظت ۲۵، g همراه نانو ذره مایرستین با غلظت ۳۷/۵ و h به همراه نانو ذره مایرستین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر

- Q1 (Annexin⁻/PI⁺): سلول‌های میکروتیک (مرگ سلولی غیر آپوپتوتیک)
- Q2 (Annexin⁺/PI⁺): سلول‌های در مرحله آپوپتوز دیررس
- Q3 (Annexin⁺/PI⁻): سلول‌های در مرحله آپوپتوز اولیه
- Q4 (Annexin⁻/PI⁻): سلول‌های زنده (Viable Cells)

۳-۷ | آپوپتوز سلولی

درصد به دست آمد، درحالی‌که در گروه تیمار شده با نانومایرستین این مقدار ۳۸/۳۷ درصد بود. این افزایش چشمگیر بیانگر آن است که نانومایرستین توانسته مسیرهای آپوپتوزی را در سلول‌های HCT116 فعال کند (شکل ۷).

نتایج به‌دست‌آمده از شکل ۷ نشان می‌دهند که تیمار سلول‌های HCT116 با نانوذره مایرستین (Nano-Drug) منجر به افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های آپوپتوتیک در مقایسه با گروه کنترل شده است ($p < 0.001$). به‌طوری‌که در گروه کنترل (HCT116)، میانگین درصد سلول‌های آپوپتوتیک ۴/۰۳



شکل ۷- مقایسه میانگین درصد آپوپتوز سلولی در گروه‌های آزمایش (ستون‌های دارای حروف متفاوت دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند $p < 0.001$).

۴ بحث

اگرچه در برخی موارد تمایل به تجمع مشاهده شد، اما این موضوع در نانوذرات مغناطیسی سنتز شده به روش هم‌رسوبی پدیده‌ای رایج محسوب می‌شود و معمولاً ناشی از برهم‌کنش‌های دوقطبی مغناطیسی و انرژی سطحی بالای ذرات است (۱۳). اصلاح سطحی با پلیمرها می‌تواند تا حد زیادی این اثر را کاهش داده و پراکنش بهتری از نانوذرات در محیط‌های زیستی ایجاد کند. بنابراین ویژگی‌های مورفولوژیکی مشاهده شده در این مطالعه نشان‌دهنده تشکیل یک سامانه نانویی مناسب برای انتقال دارو است.

نتایج آزمون رهایش نیز نشان داد که نانوفرمولاسیون طراحی شده دارای ویژگی رهایش وابسته به pH و دما است. رهایش آهسته‌تر در شرایط فیزیولوژیک طبیعی از نظر ایمنی سیستمیک اهمیت دارد زیرا از آزادسازی زودهنگام دارو جلوگیری می‌کند، درحالی‌که افزایش رهایش در شرایط اسیدی یا دمایی بالاتر می‌تواند دسترسی دارو را در بافت‌های آسیب‌دیده افزایش دهد. افزایش رهایش در محیط اسیدی نشان‌دهنده ناپایداری نسبی، تورم یا افزایش نفوذپذیری ماتریکس پلیمری در pH پایین‌تر است. چنین رفتاری از نظر درمانی اهمیت دارد، زیرا بسیاری از بافت‌های پاتولوژیک از جمله محیط‌های التهابی یا توموری دارای pH اسیدی‌تری نسبت به بافت‌های سالم هستند. Aundhia و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز به این مسئله اشاره کردند که این نانوحامل‌های هوشمند برای رهایش دارو در پاسخ به pH کم موجود در ریزمحیط توموری طراحی شده‌اند که باعث افزایش تجمع دارو در تومور و نیز کاهش اثرهای مضر جانبی می‌شوند (۱۴). در مجموع، چنین پاسخ‌پذیری محیطی برای کاربردهای درمانی هدفمند بسیار مطلوب است، زیرا موجب افزایش تجمع دارو

در این مطالعه، یک نانوسامانه مغناطیسی پلیمری برای بارگذاری و انتقال مایرستین طراحی و سنتز شد و ویژگی‌های ساختاری و اثرهای سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطان کولورکتال HCT116 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که نانوذرات سنتز شده دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب بوده و می‌توانند به‌عنوان یک حامل مؤثر برای انتقال مایرستین عمل کنند. استفاده از نانوحامل‌ها به‌ویژه برای ترکیب‌های آب‌گریز مانند فلاونوئیدها می‌توانند موجب افزایش پایداری، بهبود حلالیت و افزایش کارایی زیستی آن‌ها شود (۱ و ۸).

نتایج مشخصه‌یابی ساختاری، سنتز موفق نانوذرات مغناطیسی و تشکیل یک ساختار نانویی پایدار را تأیید کرد. نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 به دلیل زیست‌سازگاری مناسب، رفتار سوپراپارامغناطیسی و قابلیت اصلاح سطحی گسترده، در سال‌های اخیر توجه زیادی در حوزه سامانه‌های دارورسانی جلب کرده‌اند (۱۱). اصلاح سطح نانوذرات با پلیمرها می‌تواند پایداری کلوئیدی آن‌ها را افزایش داده و از تجمع ذرات جلوگیری کند و در عین حال امکان بارگذاری مؤثر مولکول‌های دارویی را فراهم سازد. مطالعه‌های پیشین نیز نشان داده‌اند که گرافتینگ پلیمری بر سطح نانوذرات مغناطیسی می‌تواند کارایی آن‌ها را در سامانه‌های دارورسانی افزایش دهد و موجب بهبود تعامل آن‌ها با محیط‌های زیستی شود (۱۲).

آنالیز اندازه ذرات نیز نشان داد که نانوذرات سنتز شده در مقیاس نانو قرار داشته و مورفولوژی نسبتاً یکنواختی دارند.

می‌دهد که نانوسامانه طراحی شده قادر است مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی را به‌طور مؤثری القا کند. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که نانوذرات مغناطیسی پلیمری سنتز شده می‌توانند به‌عنوان یک حامل مناسب برای انتقال مایرستین عمل کرده و اثرهای سایتوتوکسیک و آپوپتوزی آن را در سلول‌های سرطان کولورکتال HCT116 تقویت کنند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که استفاده از سامانه‌های نانودارورسانی می‌تواند راهبردی امیدبخش برای بهبود کارایی درمانی ترکیب‌های طبیعی ضدسرطان باشد.

۵ | نتیجه‌گیری

نانوذرات مغناطیسی پلیمری می‌توانند به‌عنوان یک سامانه مناسب برای انتقال مایرستین عمل کرده و اثرهای سایتوتوکسیک و آپوپتوزی آن را در سلول‌های سرطان کولورکتال تقویت کنند. این نانوسامانه می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد امیدبخش در توسعه راهکارهای مبتنی بر نانودارورسانی برای درمان سرطان موردتوجه قرار گیرد.

۶ | ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷ | تشکر و قدردانی

نویسندگان از کارشناسان آزمایشگاه‌های تهران مرکزی که طی انجام پژوهش در آن مرکز مساعدت نمودند، قدردانی می‌کنند.

۸ | تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافی ندارند.

۹ | سهم نویسندگان

مهرنوش مطیع: اجرای پژوهش، انجام آزمایش‌ها، جمع‌آوری و نگارش اولیه مقاله؛ **دکتر مینا رضانی:** طراحی و نظارت بر پژوهش و بازبینی علمی مقاله؛ تحلیل داده‌ها و **دکتر نسترن اصغری مقدم:** نظارت و مشاوره علمی و تحلیل داده‌ها، **دکتر همایون احمد پناهی:** مشاوره علمی، تفسیر نتایج و تحلیل داده‌ها.

در بافت‌های بیمار و کاهشی مواجهه بافت‌های سالم می‌شود. بنابراین، پروفایل رهایشی کنترل شده و حساس به محرک‌های محیطی، پتانسیل این نانوحامل را به‌عنوان یک سامانه هوشمند و کارآمد در انتقال دارو تأیید می‌کند.

مایرستین به‌عنوان یک فلاونوئید طبیعی دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی از جمله اثرهای آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی است (۱۵). مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که این ترکیب می‌تواند با مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و فعال‌سازی مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی شده، رشد تومور را مهار کند (۴ و ۵). با این حال، حلالیت پایین در آب و فراهمی زیستی محدود از مهم‌ترین چالش‌های کاربرد زیستی این ترکیب محسوب می‌شوند (۷). در این راستا، استفاده از نانوحامل‌ها می‌تواند انتقال این ترکیب به سلول‌ها را تسهیل کرده و اثربخشی آن را افزایش دهد.

نتایج آزمون MTT در این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌های HCT116 با نانوذرات حاوی مایرستین موجب کاهش قابل توجه زنده‌مانی سلولی در مقایسه با گروه کنترل شد. این کاهش زنده‌مانی احتمالاً به دلیل افزایش جذب سلولی و انتقال مؤثرتر مایرستین توسط نانوحامل است. مطالعه‌های پیشین نیز نشان داده‌اند که بارگذاری ترکیب‌های پلی‌فنولی در نانوذرات می‌تواند موجب افزایش اثرهای سایتوتوکسیک آن‌ها بر سلول‌های سرطانی شود (۱۶ و ۱۷).

علاوه بر این، نتایج فلوسایتومتری با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/PI نشان داد که تیمار سلول‌های HCT116 با نانومایرستین موجب افزایش قابل توجه جمعیت سلول‌های در حال آپوپتوز نسبت به گروه کنترل شده است. القای آپوپتوز یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های اثر بسیاری از عوامل ضدسرطان محسوب می‌شود و ترکیب‌های پلی‌فنولی مانند مایرستین می‌توانند از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده این فرایند را تحریک کنند (۱۸). Ha و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثرهای ضدتکثیری معنی‌دار و وابسته به دوز در سلول‌های سرطانی پاپای تیروئید انسان نشان دادند که مؤید اثرهای سایتوتوکسیک مایرستین می‌باشد و نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند (۱۹).

Berkoz و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که مایرستین با دوز ۲۵ میکرومول پتانسیل ضدسرطانی از طریق القای آپوپتوز و کاهش معنی‌دار در ژن‌های مقاومت دارویی (MDR-1) در سلول‌های سرطانی تخمدان را دارد (۲۰). افزایش درصد سلول‌های Annexin-Positive در نتایج فلوسایتومتری این مطالعه نشان

۱۰ | کد اخلاق

(کد اخلاق 1404. 454 IR. IAU. SRB. REC.)

۱۱ | استفاده از هوش مصنوعی

در این مقاله از هوش مصنوعی استفاده نشده است.

| **Extended Abstract**

Synthesis And Characterization of Polymeric Magnetic Nanocomposites Containing Myricetin, And Evaluation of Their Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Effects in HCT116 Colorectal Cancer Cells |

Background and Aim: Colorectal cancer (CRC) remains a significant global health challenge, necessitating the exploration of innovative therapeutic modalities. Myricetin, a naturally occurring flavonol, exhibits substantial antitumor potential; however, its clinical application is constrained by poor aqueous solubility and rapid metabolic clearance. This study aimed to design and characterize myricetin-loaded magnetic polymeric nanocomposites to enhance the therapeutic efficacy of myricetin against HCT116 human colorectal cancer cells.

Material and methods: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄/Fe₃O₄-3O₄-4Fe₃O₄ NPs) were synthesized via the chemical co-precipitation method. The surface of these nanoparticles was functionalized with a biocompatible polymer to facilitate drug loading. Physicochemical characterization was performed utilizing X-ray Diffraction (XRD), Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), Vibrating Sample Magnetometry (VSM), and Dynamic Light Scattering (DLS). The *in vitro* drug release profile was characterized using the dialysis membrane technique in a physiological buffer. The cytotoxic potential was evaluated using the MTT assay, while apoptotic cell death was quantified via Annexin V-FITC/PI flow cytometry.

Results: Morphological and structural analyses confirmed the successful synthesis of stable, drug-loaded nanocomposites. DLS analysis indicated a primary population peak at 95 nm with a PDI of 0.95. This polydispersity is attributed to the inherent magnetic dipole-dipole interactions common in Fe₃O₄-based systems. Drug release studies demonstrated a controlled (by pH and temperature), sustained-release profile, highlighting the suitability of the nanocarrier for targeted delivery. The cytotoxicity assay revealed that myricetin-loaded nanoparticles inhibited HCT116 cell proliferation in a concentration-dependent manner, with an IC₅₀ value of 37.5 µg/mL. Furthermore, flow cytometric analysis confirmed a statistically significant increase in the apoptotic population relative to the control group, suggesting that the nanocarrier effectively facilitates myricetin internalization and pro-apoptotic activity.

Conclusion: The findings of this study demonstrate that polymeric magnetic nanoparticles serve as an efficient platform for myricetin delivery, effectively overcoming its solubility limitations and enhancing its cytotoxic effect on CRC cells. The ability of this nanodrug to induce apoptosis suggests a promising avenue for developing advanced, targeted cancer therapies. Future studies focusing on *in vivo* efficacy and molecular signaling pathways are warranted to elucidate the clinical potential of this nanocomposite further.

| **Keywords**

Myricetin, Polymeric Magnetic Nanoparticles, Nanodrug Delivery, Apoptosis, HCT116 Cells, Colorectal Cancer

1. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012;161(2):505-22.
2. Wahnou H, Limami Y, Oudghiri M. Flavonoids and flavonoid-based nanoparticles for osteoarthritis and rheumatoid arthritis management. *BioChem* 2024;4(1):38-61.
3. Semwal DK, et al. Myricetin: a dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*. 2016;8(2):90.
4. Wang L, et al. Bioavailability and pharmacokinetics of myricetin. *J Food Biochem*. 2020;44(10): e13364.
5. Zhao F, et al. Myricetin attenuates liver injury. *Int Immunopharmacol*. 2019; 70:308-15.
6. Li Y, Ding Y. Minireview on flavonoids and liver protection. *Food Funct*. 2019.
7. Agraharam G, Girigoswami A, Girigoswami K. Nanoencapsulated myricetin to improve antioxidant activity and bioavailability: a study on zebrafish embryos. *Chemistry* 2021; 31;4(1):1- doi.org/10.3390/chemistry4010001
8. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18.
9. Bisht S, Khan MA, Bekhit M, Bai H, Cornish T, Mizuma M, Rudek MA, Zhao M, Maitra A, Ray B, Lahiri D. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCure™) ameliorates CCl4-induced hepatic injury and fibrosis through reduction of pro-inflammatory cytokines and stellate cell activation. *Lab Invest* 2011;91(9):1383-95. doi: 10.1038/labinvest.2011.86.
10. Sun C, Zhou Z, Li X. Polymeric nanoparticles for targeted liver drug delivery. *J Control Release*. 2021; 334:238-55.
11. Samrot AV, Sahithya CS, Selvarani J, Purayil SK, Ponnaiah P. A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2021 Jan 1; 4:100042.
12. Mishra S, Yadav MD. Magnetic nanoparticles: A comprehensive review from synthesis to biomedical frontiers. *Langmuir*. 2024 Aug 12;40(33):17239-69.
13. Shabatina TI, Vernaya OI, Shabatin VP, Melnikov MY. Magnetic nanoparticles for biomedical purposes: Modern trends and prospects. *Magnetochemistry*. 2020 Jul 17;6(3):30.
14. Aundhia C, Parmar G, Talele C, Sadhu P, Seth A. Polymeric Nanocarriers with pH-Dependent Release for Tumor-Specific Delivery. *Recent Advances in Drug Delivery and Formulation*. 2025.
15. Rahmani AH, Almatroudi A, Allemailem KS, Alwanian WM, Alharbi BF, Alrumaihi F, Khan AA, Almatroodi SA. Myricetin: a significant emphasis on its anticancer potential via the modulation of inflammation and signal transduction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Jun 2;24(11):9665.
16. Yang B, Dong Y, Wang F, Zhang Y. Nanoformulations to enhance the bioavailability and physiological functions of polyphenols. *Molecules*. 2020 Oct 10;25(20):4613.
17. Unnikrishnan Meenakshi D, Narde GK, Ahuja A, Al Balushi K, Francis AP, Khan SA. Therapeutic applications of nanoformulated resveratrol and quercetin phytochemicals in colorectal cancer—an updated review. *Pharmaceutics*. 2024 Jun 4;16(6):761.
18. Imran M, Saeed F, Hussain G, Imran A, Mehmood Z, Gondal TA, El-Ghorab A, Ahmad I, Pezzani R, Arshad MU, Bacha U. Myricetin: A comprehensive review on its biological potentials. *Food science & nutrition*. 2021 Oct;9(10):5854-68.
19. Ha, T. K., Jung, I., Kim, M. E., Bae, S. K., & Lee, J. S. (2017). Anti-cancer activity of myricetin against human papillary thyroid cancer cells involves mitochondrial dysfunction-mediated apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.100>.

20. Berköz, M., Yalın, S., Özkan-Yılmaz, F., Özlüer-Hunt, A., Krośniak, M., Francik, R., Yunusoğlu, O., Adıyaman, A., Gezici, H., Yiğit, A., Ünal, S., Volkan, D., & Yıldırım, M. (2021). Protective effect of myricetin, apigenin, and hesperidin pretreatments on cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 43(3), 353–369. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1916525>.