

## Summary

The present state of cancer chemotherapy is unsatisfactory. New anticancer drugs that marginally improve the survival of patients continue to be developed at an unsustainably high cost. The study aimed to elucidate the effects of insulin (INS), an inexpensive drug with a convincing safety profile, on the susceptibility of breast and colon cancer to chemotherapeutic agents: 5-fluorouracil (FU), oxaliplatin (OXA), irinotecan (IRI), cyclophosphamide (CPA) and docetaxel (DOC). To examine the effects of insulin on cell viability and apoptosis, we performed an *in vitro* analysis on cancer cell lines Caco-2, SW480 and MCF-7. To verify the results, we performed *in vivo* analysis on mice bearing tumors. To investigate and establish the possible mechanisms of this phenomenon, we assessed cell proliferation, induction of apoptosis, activation of apoptotic and autophagic pathways, expression of glucose transporters 1 and 3, formation of reactive oxygen species, wound-healing assay, and mRNA expression of pathways related to the signaling downstream of insulin receptors (INSR). Moreover, we performed Western blotting to confirm expression patterns derived from the genetic analysis. For the quantification of circulating tumor cells in the peripheral blood, we used the maintrac method. To analyze the antitumor effect of novel glucose derivatives we have performed cell viability analysis on three cancer cell lines: MCF-7 human breast cancer cell line and human colon cancer cell lines: Caco-2, SW480. We further assessed whether insulin can enhance the antitumor effect of these compounds. To investigate and establish the possible mechanisms of this phenomenon, we assessed cell proliferation, cell migration and motility, expression of glucose transporter 1 (GLUT-1) and apoptotic proteins (caspase-3, BAX).

The results of our study show that insulin pretreated colon and breast cancer cells are significantly more susceptible to commonly used chemotherapeutics. The *in vivo* analysis confirmed that insulin could enhance the effect of the tested chemotherapeutic while showing no toxicity. The underlying mechanism can be related to the downregulation of PIK3CA and GRB2, which are crucial for growth, proliferation, survival, and migration of cancer cells. Moreover, we report the discovery of novel compounds in which sugar is linked to aglycone in an efficient manner through S-

glycosidic bond. Our research conducted on breast and colon cancer cell lines demonstrated potent cytotoxic activity, which was significantly enhanced in the presence of insulin. We found that insulin can increase the cytotoxic action of glucose-conjugates up to two-fold.

The approach based on the combination of insulin, chemotherapeutics, and/or glucose derivatives has a great deal of potential and a considerable opportunity for growth. Further preclinical experiments are warranted to determine the clinical utility of the strategy.

## **Streszczenie**

Obecne wyniki leczenia pacjentów z nowotworami litymi z wykorzystaniem klasycznej chemioterapii są niezadowalające. Koszty rozwoju i rejestracji nowych leków przeciwnowotworowych, które marginalnie poprawiają przeżycie pacjentów, stale wzrastają. Badanie miało na celu wyjaśnienie wpływu insuliny (INS), niedrogiego leku o przekonującym profilu bezpieczeństwa, na wrażliwość komórek raka piersi (BC) i raka jelita grubego (CRC) na chemioterapeutyki: 5-fluorouracyl (FU), oksaliplatyna (OXA), irynotekan (IRI), cyklofosfamid (CPA) i docetaksel (DOC). W celu oceny wpływu insuliny na przeżywalność komórek i apoptozę, przeprowadzono badania *in vitro* na liniach komórek nowotworowych Caco-2, SW480 i MCF-7. Ocena działania na modelu zwierzęcym została przeprowadzona na myszach Balb/c z guzem CRC. W celu wyjaśnienia mechanizmów tego zjawiska oceniono wskaźnik żywotności komórek, indukcję apoptozy, aktywację szlaków apoptotycznych i autofagicznych, ekspresję transporterów glukozy 1 i 3, tworzenie reaktywnych form tlenu, test proliferacji i migracji komórek „wound-healing assay” i ekspresję mRNA genów zaangażowanych w szlaki komórkowe aktywowane przez insulinę. Ponadto przeprowadzono Western blotting, aby potwierdzić wzorce ekspresji pochodzące z analizy genetycznej z ekspresją białek. Do oceny ilościowej krążących komórek nowotworowych we krwi obwodowej zastosowano metodę maintrac. Ponadto przeprowadzono ocenę aktywności przeciwnowotworowej nowych pochodnych glukozy za pomocą testu MTT. Następnie oceniono, czy insulina może wzmacniać działanie przeciwnowotworowe tych związków. Aby zbadać i ustalić możliwe mechanizmy tego zjawiska, oceniono wskaźnik

żywności komórek, proliferację i migrację komórek, ekspresję transportera glukozy 1 (GLUT-1) i białek apoptotycznych (kaspaza-3, BAX). Wyniki badań wskazują, że komórki BC i CRC poddane wcześniej działaniu insuliny są znacznie bardziej podatne na powszechnie stosowane chemioterapeutyki. Analiza in vivo potwierdziła, że insulina wzmacnia działanie badanego chemioterapeutyku, nie wykazując jednocześnie toksyczności. Podstawowy mechanizm może być związany z hamowaniem ekspresji PIK3CA i GRB2, które są kluczowe dla wzrostu, proliferacji, przeżycia i migracji komórek nowotworowych. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych raka piersi i jelita grubego wykazały, że nowe pochodne glukozy, w których cukier jest skutecznie połączony z aglikonem poprzez wiązanie S-glikozydowe, charakteryzują się wysoką aktywnością cytotoksyczną, która ulega wzmożeniu w obecności insuliny. INS może zwiększyć działanie cytotoksyczne koniugatów glukozy nawet dwukrotnie poprzez nadekspresję receptorów GLUT.

Podejście oparte na połączeniu egzogennej insuliny, chemioterapeutyków i/lub pochodnych glukozy posiada olbrzymi potencjał terapeutyczny oraz może stanowić skuteczną i bezpieczną metodę leczenia nowotworów piersi i jelita grubego.