



Dipartimento di Scienze di Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia curriculum Biomedico e Biomolecolare

ELABORATO FINALE

**Effetti della microgravità simulata sul metabolismo e sui mitocondri della
linea cellulare HEK293: analisi molecolare e funzionale.**

Candidata: Uenda Duka

Relatrice: Prof.ssa Maria Angela Masini

Stage svolto presso Università del Piemonte Orientale

Co-relatrice: Dott.ssa Corinna Anais Pagano

Anno Accademico 2025/2026

"Lo scienziato deve fare ordine: la scienza si fa con i fatti così come una casa si fa con i mattoni, ma l'accumulazione dei fatti non è scienza più di quanto un mucchio di mattoni non sia una casa"

Jules Henri Poincaré

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 La gravità come fattore biologico.....	1
1.2 Microgravità e Microgravità Simulata.....	2
1.2.1 Modelli di microgravità simulata.....	3
1.3 Effetti Biologici della Microgravità sulle Cellule.....	5
1.3.1 Alterazioni del citoscheletro e meccano-trasduzione.....	5
1.3.2 Prolifera-zione, apoptosi e differenziazione.....	6
1.3.3 Adesione cellulare e interazioni con ECM.....	8
1.3.4 Funzione mitocondriale.....	9
1.4 Metabolismo Cellulare.....	10
1.4.1 Metabolismo energetico.....	10
1.4.2 Ruolo dei mitocondri.....	11
1.4.3 Plasticità metabolica.....	11
1.5 Microgravità e Metabolismo Cellulare.....	12
1.5.1 Evidenze sperimentali.....	12
1.5.2 Alterazioni mitocondriali in microgravità simulata.....	13
1.5.3 Impatto su pathway metabolici.....	14
1.6 Marcatori Molecolari Analizzati.....	14
1.6.1 <i>GLUT-1</i> : Metabolismo del glucosio.....	15
1.6.2 <i>LDHA</i> e <i>LDHB</i> : Metabolismo del lattato.....	15
1.6.3 <i>HK1</i> : Fosforilazione del glucosio e regola-zione della funzione mitocondriale.....	16
1.6.4 <i>SOD1</i> e <i>SOD2</i> : Stress ossidativo.....	17
1.6.5 <i>PGC-1α</i> : Biogenesi mitocondriale	17
1.6.6 <i>MITF</i> : Funzione mitocondriale.....	18
1.7 Razionale dello Studio.....	18
2. MATERIALI E METODI.....	19
2.1 Modello Cellulare HEK293	20
2.2 Estrazione RNA e RT-qPCR.....	20
2.3 Citofluorimetria (MitoTracker®).....	22
2.4 Quantificazione ATP.....	23
2.5 Analisi del Consumo di Ossigeno.....	24
2.6 Inclusione in Resina.....	26
2.7 Acquisizione delle Immagini mediante Microscopia Ottica.....	27
2.8 Analisi statistica.....	27
3. SCOPO DEL LAVORO.....	28
4. RISULTATI.....	30
4.1 Alterazioni Morfologiche indotte dalla Microgravità Simulata.....	30
4.2 Riprogrammazione Metabolica indotta dalla microgravità simulata...	31

4.3 Valutazione del Contenuto Mitocondriale mediante Citofluorimetria...	36
4.4 Valutazione del Contenuto di ATP.....	37
4.5 Analisi del Consumo di Ossigeno (OCR).....	38
4.6 Analisi Morfologia degli Sferoidi mediante Sezioni Istologiche.....	41
5. DISCUSSIONE & CONCLUSIONI.....	44
6. BIBLIOGRAFIA.....	51

1. INTRODUZIONE

1.1 La Gravità come Fattore Biologico

La gravità rappresenta uno dei principali fattori fisici che hanno influenzato e plasmato l'evoluzione dei sistemi biologici sulla Terra. Tutti gli organismi viventi si sono sviluppati in presenza di un campo gravitazionale pressoché costante pari a circa 1 g (9.81 m/s^2), condizione che ha contribuito a modellare numerosi aspetti della morfologia, della fisiologia e dell'organizzazione cellulare degli esseri viventi nel corso del tempo (Narayanan. 2023).

Dal punto di vista fisico, la gravità si manifesta come un'accelerazione costante che agisce su tutti i corpi dotati di massa. In ambito biologico, questo si traduce in un carico meccanico continuo che rappresenta uno stimolo ambientale permanente per le cellule, contribuendo alla distribuzione delle forze intracellulari e al mantenimento dell'equilibrio meccanico tra le diverse componenti strutturali.

La variazione del campo gravitazionale, come avviene in condizioni di microgravità, determina una perturbazione di questi equilibri meccanici. La microgravità non implica l'assenza del campo gravitazionale, bensì una sua marcata riduzione (circa 10^{-3} - 10^{-6} g nelle condizioni orbitali).

Nei sistemi di microgravità simulata, invece, il vettore gravitazionale terrestre mantiene un'intensità pari a 1 g, ma viene continuamente riorientato nello spazio, impedendo alle cellule la percezione di una direzione gravitazionale stabile nel tempo. In entrambi i casi, la perdita di un segnale meccanico direzionale costante rappresenta una perturbazione per l'omeostasi cellulare.

Negli ultimi decenni, lo sviluppo delle missioni spaziali e la prospettiva di permanenze umane prolungate nello spazio hanno stimolato un crescente interesse verso lo studio degli effetti della microgravità sui sistemi biologici. In questo contesto, la riduzione del segnale gravitazionale rappresenta una condizione sperimentale utile per indagare il ruolo delle forze fisiche nella regolazione dei processi cellulari e nei meccanismi di adattamento biologico (van den Nieuwenhof et al. 2024; López Garzón et al. 2025).

1.2 Microgravità e Microgravità Simulata

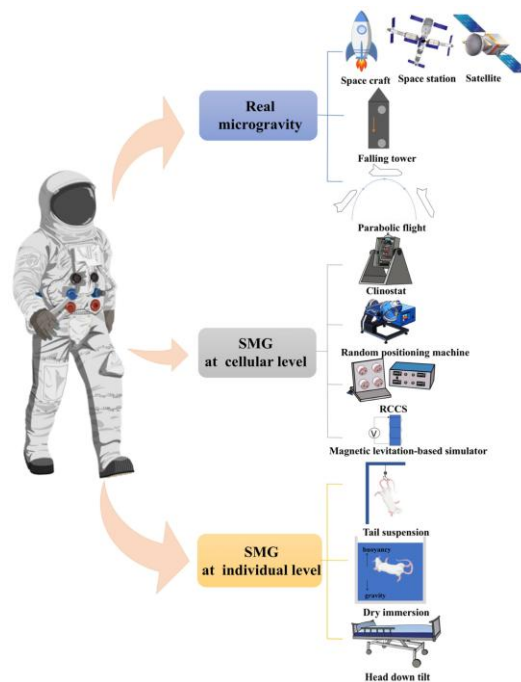


Figura 1: Rappresentazione grafica di diversi metodi per studiare gli effetti della microgravità o microgravità simulata. Immagine da: Chen et al. 2025.

Nel contesto della letteratura scientifica, è comune distinguere tra microgravità reale ($r\mu g$) e microgravità simulata ($s\mu g$). La microgravità reale si verifica in condizioni di caduta libera, come nelle missioni spaziali orbitali o i voli parabolici, mentre la microgravità simulata viene ottenuta mediante dispositivi che alterano nel tempo la percezione del vettore gravitazionale senza alterarne l'intensità (Herranz et al. 2013). Per questo motivo, gran parte degli studi biologici viene condotta mediante modelli di microgravità simulata (Simulated Microgravity, SMG), che consentono di riprodurre una condizione in cui il vettore gravitazionale non viene percepito come stabile dal sistema biologico, permettendo l'analisi controllata delle risposte cellulari e molecolari indotte da questo particolare ambiente fisico (Herranz et al. 2013; Wuest et al. 2015). Nei sistemi di microgravità simulata, il vettore gravitazionale terrestre mantiene un'intensità costante pari a 1 g, ma viene continuamente riorientato nello spazio. Di conseguenza, pur essendo sempre presente, il segnale gravitazionale non risulta stabile dal punto di vista direzionale. Questo fenomeno, noto come *gravity*

vector averaging, determina una condizione funzionalmente assimilabile alla microgravità (Wuest et al. 2015).

Nel complesso, i sistemi di microgravità simulata rappresentano strumenti consolidati per lo studio delle risposte cellulari in condizioni controllate e riproducibili, consentendo di investigare gli effetti della riduzione del segnale gravitazionale su numerosi processi biologici.

1.2.1 Modelli di microgravità simulata

Per lo studio degli effetti della microgravità in condizioni di laboratorio, sono stati sviluppati diversi sistemi in grado di riprodurre la riduzione del vettore gravitazionale attraverso approcci meccanici. Tra questi, i dispositivi basati su rotazione rappresentano le piattaforme più diffuse e includono clinostati e sistemi più avanzati come il Random Positioning Machine (RPM) (Ferranti et al. 2020; Hasenstein & van Loon, 2015).

I clinostati rappresentano uno dei primi dispositivi utilizzati per la simulazione della microgravità e si basano sulla rotazione del campione attorno a uno o più assi a velocità costante. Questo movimento consente di modificare continuamente l'orientamento del sistema biologico rispetto al vettore gravitazionale, riducendo nel tempo la percezione direzionale. In base alla configurazione, si distinguono clinostati a singolo asse (1D e 2D) e sistemi tridimensionali (3D), nei quali l'aggiunta di un secondo asse consente una più efficace dispersione della componente direzionale della gravità (Hasenstein & van Loon, 2015; Kim et al. 2016).

Un'evoluzione più avanzata di questo principio è rappresentata dal Random Positioning Machine (RPM), un dispositivo costituito da due telai perpendicolari che ruotano indipendentemente, consentendo un riorientamento continuo e casuale del campione nello spazio.

Questo meccanismo determina una continua variazione della direzione del vettore gravitazionale, che nel tempo viene mediata attraverso il continuo riorientamento spaziale, pur non essendo mai completamente eliminato (Ferranti et al. 2020). A differenza dei clinostati, nell'RPM sia la velocità sia la direzione di rotazione variano in modo casuale, impedendo alle cellule di adattarsi a uno stimolo meccanico

coerente. Quando la frequenza di rotazione è sufficientemente elevata rispetto ai tempi di risposta biologica, le cellule sperimentano una condizione funzionalmente assimilabile alla microgravità (Ferranti et al. 2020).

Un aspetto critico nell'utilizzo del RPM è rappresentato dal posizionamento dei campioni rispetto al centro di rotazione. L'aumento della distanza dagli assi comporta infatti l'incremento delle forze centrifughe, rendendo necessario mantenere i campioni il più possibile in prossimità del centro del sistema per garantire condizioni sperimentali controllate (Ferranti et al. 2020).

Un ulteriore elemento da considerare riguarda la dinamica dei fluidi all'interno delle flask di coltura. La rotazione del sistema può infatti aumentare il movimento del mezzo, generando forze di taglio (shear stress) e fenomeni convettivi che possono influenzare il comportamento cellulare. Per questo motivo, è fondamentale minimizzare la presenza di bolle d'aria, riempiendo le flask di terreno e quindi definire con precisione le condizioni sperimentali, al fine di limitare effetti non specifici (Ayyaswamy & Mukundakrishnan, 2007).

Oltre alla simulazione della microgravità, l'RPM trova applicazione anche nello studio della crescita tridimensionale cellulare. In condizioni di elevata densità cellulare, infatti, il continuo riorientamento spaziale favorisce le interazioni cellula-cellula e la formazione di strutture tridimensionali, quali gli sferoidi, che rappresentano modelli più fisiologici rispetto alle colture bidimensionali tradizionali (Ferranti et al. 2020).

Nel complesso, sebbene i sistemi di microgravità simulata presentino limitazioni intrinseche e non riproducano perfettamente l'ambiente spaziale, essi costituiscono strumenti consolidati per l'analisi delle risposte cellulari in condizioni controllate e riproducibili.

1.3 Effetti Biologici della Microgravità sulle Cellule

La riduzione del carico gravitazionale determina una perturbazione significativa degli equilibri meccanici e funzionali che regolano il comportamento cellulare. Come accennato nel paragrafo precedente, tali condizioni influenzano diversi processi biologici fondamentali, ma gli effetti osservati non sono riconducibili a un singolo meccanismo, bensì a una risposta integrata che coinvolge più livelli dell'organizzazione cellulare, dai sistemi strutturali ai pathway di segnalazione. In questo contesto, la microgravità induce una riorganizzazione delle proprietà biomeccaniche e dei sistemi di segnalazione associati, con conseguenze su struttura, adesione, proliferazione e metabolismo cellulare (van den Nieuwenhof et al. 2024; López Garzón et al. 2025).

Alla luce di questa complessità, risulta necessario analizzare in modo sistematico i principali adattamenti cellulari indotti dalla microgravità. Nei paragrafi seguenti verranno quindi approfonditi i principali effetti della microgravità a livello cellulare, con particolare attenzione alle modificazioni del citoscheletro e dei meccanismi di meccanotrasduzione, ai processi di proliferazione e sopravvivenza, alle interazioni con la matrice extracellulare e alle alterazioni della funzione mitocondriale.

1.3.1 Alterazioni del citoscheletro e meccanotrasduzione

Il citoscheletro rappresenta uno dei principali sensori attraverso cui le cellule percepiscono e rispondono agli stimoli meccanici, inclusa la forza gravitazionale. Questa rete dinamica, composta da microfilamenti di actina, filamenti intermedi e microtubuli, non solo garantisce l'integrità strutturale e la polarità della cellula, ma svolge un ruolo centrale nella meccanotrasduzione, ovvero nella conversione di stimoli meccanici in risposte biochimiche.

In condizioni fisiologiche (1g), le cellule mantengono uno stato di equilibrio meccanico noto come *tensegrità*, in cui le forze di tensione e compressione sono distribuite in modo bilanciato all'interno della cellula. Questo stato di equilibrio è mediato da strutture specializzate come le integrine e le adesioni focali, che consentono la trasmissione delle forze dalla matrice extracellulare (ECM) al citoscheletro e, successivamente, al nucleo, influenzando l'espressione genica.

In condizioni di microgravità reale o simulata, la perdita di un riferimento gravitazionale direzionale stabile determina una significativa perturbazione di questo equilibrio.

Studi sperimentali hanno evidenziato che la microgravità simulata può determinare una riduzione delle adesioni focali, accompagnata da alterazioni dell'organizzazione citoscheletrica e del posizionamento nucleare (Zhao et al. 2018). Nei sistemi di microgravità simulata, il continuo riorientamento del campione rispetto al vettore gravitazionale genera il fenomeno del *gravity vector averaging*, che impedisce alle cellule di percepire un segnale meccanico costante nel tempo, alterando i processi di meccanotrasduzione (Wuest et al. 2015).

Parallelamente, la riduzione degli stimoli meccanici si riflette sull'attività dei pathway di segnalazione intracellulare. La minore tensione sulle adesioni focali modula l'attività di vie di segnalazione mecano-sensibili, con conseguenze dirette sui processi di proliferazione, sopravvivenza e differenziazione cellulare.

Un ruolo chiave in questo contesto è svolto dal collegamento meccanico tra citoscheletro e nucleo, mediato dal complesso LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton). Questo sistema proteico consente la trasmissione delle forze alla lamina nucleare e alla cromatina, contribuendo alla regolazione dell'organizzazione nucleare e dell'espressione genica (Chang et al. 2015). Le alterazioni citoscheletriche indotte dalla microgravità possono quindi propagarsi al nucleo, influenzando l'organizzazione della cromatina e l'accessibilità del DNA, con conseguente modulazione dei programmi trascrizionali cellulari (Uzer et al. 2015).

Nel loro insieme, questi dati indicano che il citoscheletro e le strutture di adesione rappresentano uno dei primi livelli di risposta cellulare alla riduzione del carico gravitazionale.

1.3.2 Proliferazione, apoptosi e differenziazione

L'esposizione alla microgravità è stata associata ad alterazioni dei processi di proliferazione, sopravvivenza e differenziazione cellulare. Tuttavia, gli effetti osservati risultano altamente dipendenti dal tipo cellulare, dal modello sperimentale

utilizzato e dalla durata dell'esposizione, evidenziando una marcata variabilità nella risposta biologica (Grimm et al. 2020; Wuest et al. 2015).

Numerosi studi hanno dimostrato che la microgravità può influenzare la progressione del ciclo cellulare, determinando in molti casi una riduzione della proliferazione e un arresto in specifiche fasi del ciclo. Ad esempio, in modelli tumorali, la microgravità simulata è stata associata a una riduzione della capacità proliferativa, come evidenziato nelle cellule di glioma umano U251, in cui tale effetto risulta accompagnato dalla modulazione di regolatori chiave del ciclo cellulare, tra cui p21-inibitore delle chinasi-ciclina-dipendenti e IGFBP-2 (Zhao et al. 2017).

Analogamente, in cellule staminali embrionali, condizioni di microgravità sono state correlate a una diminuzione della proliferazione cellulare, associata a cambiamenti riconducibili a fenomeni di senescenza (Mao et al. 2024).

Parallelamente, la microgravità modula i processi di sopravvivenza cellulare attraverso l'attivazione di pathway apoptotici. In diversi studi condotti su differenti modelli cellulari è stato osservato un incremento dell'apoptosi sia in condizioni di microgravità reale che simulata, spesso associato all'attivazione della via mitocondriale dell'apoptosi e a un incremento dello stress ossidativo (Grimm et al. 2020). In questo contesto, il rilascio di citocromo c e l'attivazione della cascata delle caspasi rappresentano meccanismi centrali nella risposta cellulare alla microgravità (Grimm et al. 2020).

Tuttavia, nonostante questa tendenza generale, risultati contrastanti sono stati riportati in alcuni modelli, suggerendo che, in determinate condizioni, le cellule possano attivare pathway pro-sopravvivenza, come Akt ed ERK. In particolare, in cellule di carcinoma mammario (MCF-7) e cellule epiteliali mammarie non tumorali (MCF10A), è stato osservato che la microgravità induce l'attivazione differenziale di tali pathway, contribuendo a modulare la risposta apoptotica in funzione dello stato cellulare e delle condizioni di adesione (Monti et al. 2021).

Oltre a questi effetti, la microgravità può influenzare i processi di differenziazione cellulare, modulando il destino e lo stato funzionale delle cellule. Studi sperimentali hanno evidenziato alterazioni nei programmi differenziativi e nei processi di commitment cellulare, suggerendo un'interferenza con i segnali che regolano il

destino cellulare (Mao et al. 2024). Tali effetti risultano in parte mediati da cambiamenti nelle proprietà biomeccaniche cellulari e nei sistemi di segnalazione intracellulare, in continuità con le alterazioni del citoscheletro e della meccanotrasduzione.

Nel complesso, questi dati evidenziano come la microgravità coinvolga in maniera integrata i meccanismi che regolano proliferazione, sopravvivenza e differenziazione cellulare, riflettendo una stretta interazione tra segnali meccanici e pathway intracellulari e stato metabolico della cellula.

1.3.3 Adesione cellulare e interazioni con ECM

L'adesione cellulare e le interazioni con la matrice extracellulare (ECM) rappresentano elementi fondamentali nella regolazione del comportamento cellulare, in quanto mediano la trasmissione di segnali meccanici e biochimici tra ambiente extracellulare e citoscheletro. Tali interazioni sono principalmente regolate dalle integrine, recettori transmembrana che collegano la ECM ai filamenti di actina attraverso complessi multiproteici noti come adesioni focali.

Le adesioni focali costituiscono piattaforme dinamiche di segnalazione che regolano la trasduzione del segnale in risposta alle condizioni meccaniche del microambiente. Tra i principali mediatori di questi processi rientrano proteine come FAK (Focal Adhesion Kinase) e membri della famiglia Src, la cui attività è strettamente dipendente dalle forze meccaniche applicate alla cellula.

In condizioni di microgravità, la perdita di un segnale meccanico direzionale stabile si traduce in una disorganizzazione delle adesioni focali e in una riduzione dell'efficacia dell'ancoraggio cellula-substrato. Studi sperimentali hanno evidenziato alterazioni nell'espressione e nella distribuzione delle integrine, accompagnate da una riorganizzazione delle strutture di adesione e da una riduzione delle focal adhesions (Wuest et al. 2015; Zhao et al. 2018; Grimm et al. 2020).

A livello funzionale, queste modificazioni si traducono in cambiamenti significativi nel comportamento cellulare: in diversi modelli, la riduzione delle interazioni cellula-substrato favorisce il distacco delle cellule e la loro aggregazione in strutture tridimensionali, come sferoidi. Questo fenomeno riflette uno sbilanciamento tra

adesione alla matrice e interazioni cellula-cellula, che risultano relativamente preservate, promuovendo l'auto-organizzazione tridimensionale (van den Nieuwenhof et al. 2024; Grimm et al. 2020). In questo contesto, anche le molecole di adesione cellula-cellula (Cell Adhesion Molecules, CAMs), come le caderine, possono contribuire alla stabilizzazione delle interazioni intercellulari e alla formazione di strutture tridimensionali (Grimm et al. 2020).

La disorganizzazione delle adesioni focali si associa inoltre a una modulazione delle vie di segnalazione dipendenti da FAK e Src, contribuendo a effetti su processi cellulari quali proliferazione, sopravvivenza e migrazione, in continuità con quanto descritto nei paragrafi precedenti.

Nel complesso, la microgravità determina una riorganizzazione delle interazioni cellula-ECM che contribuisce in modo significativo alle alterazioni strutturali e funzionali osservate a livello cellulare.

1.3.4 Funzione mitocondriale

I mitocondri rappresentano organuli intracellulari eucariotici fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, in quanto responsabili della produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa. (Alberts B. 2015 *Biologia molecolare della cellula*; Zanichelli). Oltre al ruolo energetico, essi partecipano attivamente alla regolazione di processi cellulari fondamentali, quali proliferazione, sopravvivenza, differenziamento e morte cellulare programmata. I mitocondri costituiscono inoltre un importante punto di integrazione tra metabolismo energetico e segnali di stress, risultando particolarmente sensibili alle variazioni del microambiente cellulare.

Un aspetto centrale della funzione mitocondriale è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che a livelli fisiologici agiscono come molecole di segnalazione, mentre in condizioni di stress possono contribuire all'attivazione di pathway apoptotici. In particolare, eventi quali la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e il rilascio di fattori pro-apoptotici, tra cui il citocromo c, rappresentano passaggi chiave nella regolazione della morte cellulare.

Alla luce del loro ruolo nella produzione di energia, nella regolazione dello stato redox e nei processi di sopravvivenza cellulare, i mitocondri rappresentano un

bersaglio rilevante delle alterazioni indotte dalla microgravità. Per questo motivo, la funzione mitocondriale costituisce un nodo centrale nello studio dei meccanismi di adattamento cellulare a condizioni ambientali non fisiologiche, incluse la microgravità reale e simulata.

1.4 Metabolismo Cellulare

Il metabolismo cellulare rappresenta un sistema dinamico e altamente regolato che integra produzione energetica, biosintesi e mantenimento dell'equilibrio redox. Nelle cellule eucariotiche, tale sistema si basa sull'interazione tra processi citosolici e mitocondriali, la cui coordinazione consente di adattare il flusso metabolico alle esigenze funzionali e alle condizioni ambientali.

Il metabolismo è soggetto a un continuo rimodellamento in risposta a stimoli extra e intracellulari, inclusi segnali meccanici, variazioni nella disponibilità di nutrienti e condizioni di stress. Questa capacità adattativa rappresenta un elemento centrale nella regolazione del comportamento cellulare e permette alla cellula di mantenere l'omeostasi anche in contesti ambientali sfavorevoli. (Alberts B. 2015 *Biologia molecolare della cellula*; Zanichelli).

1.4.1 Metabolismo energetico

Il metabolismo energetico cellulare si fonda principalmente sull'integrazione tra glicolisi e fosforilazione ossidativa. In condizioni fisiologiche, queste due vie operano in modo coordinato, garantendo un equilibrio tra efficienza energetica e flessibilità metabolica.

La glicolisi consente la degradazione del glucosio nel citosol con produzione di ATP e intermedi metabolici utilizzabili in processi biosintetici, mentre la fosforilazione ossidativa mitocondriale costituisce la principale fonte di ATP nelle cellule aerobiche, grazie all'attività della catena di trasporto degli elettroni.

Tuttavia, in specifiche condizioni funzionali o di stress, le cellule possono adottare strategie metaboliche alternative, aumentando il flusso glicolitico anche in presenza di ossigeno, fenomeno descritto in diversi contesti biologici e patologici come glicolisi aerobica (Vander Heiden et al. 2009).

Questo shift metabolico non rappresenta semplicemente una riduzione dell'efficienza

energetica, ma riflette un adattamento funzionale che consente di sostenere processi biosintetici e risposte rapide ai cambiamenti ambientali.

1.4.2 Ruolo dei mitocondri nel metabolismo energetico

I mitocondri svolgono un ruolo centrale nel metabolismo cellulare, non solo come sede della produzione di ATP, ma anche come hub di integrazione tra segnali energetici e redox. Attraverso la catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa, i mitocondri coordinano il trasferimento di elettroni e la sintesi di ATP, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi energetica (Brand & Nicholls, 2011).

Parallelamente, essi rappresentano una delle principali fonti intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che a livelli controllati agiscono come molecole segnale, mentre in condizioni di squilibrio possono promuovere stress ossidativo e danno cellulare. Alterazioni della funzione mitocondriale si traducono quindi in modificazioni del bilancio energetico e ossidativo con effetti diretti su proliferazione, sopravvivenza e adattamento cellulare (Wallace, 2012).

1.4.3 Plasticità metabolica

Le cellule eucariotiche possiedono una marcata plasticità metabolica, che consente loro di modulare dinamicamente l'utilizzo delle diverse vie energetiche in risposta a stimoli ambientali e funzionali. La flessibilità metabolica si manifesta nella capacità di riconfigurare i flussi metabolici tra glicolisi e metabolismo ossidativo, ma coinvolge anche pathway biosintetici, sistemi di regolazione redox e programmi di adattamento cellulare (Alberts B. 2015 *Biologia molecolare della cellula*; Zanichelli).

La plasticità metabolica permette quindi di mantenere l'omeostasi cellulare anche in presenza di condizioni non fisiologiche, inclusi stress meccanici, alterazioni del microambiente e cambiamenti nello stato proliferativo. In questo contesto, anche la microgravità simulata rappresenta un modello di particolare interesse per lo studio dei meccanismi di adattamento metabolico. In cellule di carcinoma pancreatico, ad esempio, l'esposizione prolungata alla μg è stata associata a una riorganizzazione coordinata dei pathway metabolici e a modificazioni dello stato funzionale cellulare, evidenziando una marcata plasticità metabolica (Masini et al. 2022).

La plasticità metabolica rappresenta un elemento chiave della capacità adattativa cellulare, poiché consente di integrare richieste energetiche, segnali di stress e variazioni del microambiente. Alla luce di queste considerazioni, condizioni non fisiologiche come la microgravità reale o simulata costituiscono un contesto sperimentale particolarmente rilevante per analizzare come le cellule rimodellino i propri pathway energetici e mitocondriali in risposta a una perturbazione del segnale meccanico.

1.5 Microgravità e Metabolismo Cellulare

La microgravità, reale o simulata, è in grado di modulare in maniera significativa il metabolismo cellulare, interferendo con i processi che regolano la produzione energetica, l'omeostasi redox e l'adattamento metabolico. Evidenze recenti indicano che la riduzione del carico gravitazionale è associata a una riorganizzazione coordinata dei pathway metabolici, coinvolgendo sia il metabolismo glicolitico sia la funzione mitocondriale (Thiel et al. 2021; López Garzón et al. 2025; van den Nieuwenhof et al. 2024).

Tali alterazioni risultano strettamente connesse ai cambiamenti strutturali e biomeccanici descritti nei paragrafi precedenti. In particolare, la disorganizzazione del citoscheletro e le alterazioni delle adesioni focali possono influenzare direttamente la funzione mitocondriale e la regolazione dei pathway energetici cellulari, evidenziando una stretta integrazione tra segnali meccanici e metabolismo cellulare.

1.5.1 Evidenze sperimentali

Diversi studi hanno documentato che l'esposizione a microgravità, sia reale che simulata, è associata a modificazioni del metabolismo energetico cellulare. In particolare, sono state osservate variazioni del consumo di ossigeno, della produzione di ATP e dell'attività mitocondriale, suggerendo una modulazione dell'equilibrio tra metabolismo ossidativo e glicolitico (van den Nieuwenhof et al. 2024; Grimm et al. 2020).

Recenti studi hanno inoltre evidenziato che la microgravità simulata può aumentare

il contenuto mitocondriale, il potenziale di membrana mitocondriale e la produzione di ATP, suggerendo una riorganizzazione metabolica associata ai processi di adattamento cellulare (Forghani et al. 2024). A livello molecolare, tali effetti si accompagnano a cambiamenti nell'espressione di geni coinvolti nella regolazione metabolica, nella risposta allo stress ossidativo e nella biogenesi mitocondriale (Grimm et al. 2020).

Tuttavia, la risposta cellulare appare fortemente dipendente dal tipo cellulare, dal modello sperimentale e dalla durata dell'esposizione. In questo contesto, alcune evidenze suggeriscono una possibile dipendenza temporale della risposta metabolica alla microgravità: esposizioni di breve durata sono spesso associate a condizioni di stress metabolico, mentre esposizioni prolungate possono favorire l'attivazione di meccanismi adattativi e una riorganizzazione più stabile dei pathway energetici (Grimm et al. 2020; López Garzón et al. 2025).

1.5.2 Alterazioni mitocondriali in microgravità simulata

I mitocondri rappresentano uno dei principali bersagli cellulari delle condizioni di microgravità, in virtù del loro ruolo centrale nell'integrazione tra metabolismo energetico e segnali di stress (Grimm et al. 2020; López Garzón et al. 2025). Studi sperimentali hanno evidenziato alterazioni della respirazione mitocondriale, della produzione di ATP e dell'equilibrio redox in risposta all'esposizione a microgravità simulata. Tali modificazioni sono spesso accompagnate da cambiamenti nella dinamica mitocondriale, inclusi processi di fusione e fissione, e da una riorganizzazione della rete mitocondriale intracellulare (Forghani et al. 2024).

Un ulteriore elemento di rilievo riguarda il legame tra citoscheletro e funzione mitocondriale. Come descritto nei paragrafi precedenti, l'integrità della rete citoscheletrica è fondamentale per il corretto posizionamento e traffico dei mitocondri; pertanto, le alterazioni citoscheletriche indotte dalla microgravità possono riflettersi direttamente sulla distribuzione e sull'attività mitocondriale.

Nel loro insieme, queste evidenze indicano che la funzione mitocondriale rappresenta un nodo centrale nell'adattamento cellulare alla microgravità.

1.5.3 Impatto su pathway metabolici

Tra gli effetti metabolici maggiormente studiati in condizioni di microgravità rientrano le alterazioni della produzione di ATP e della regolazione dello stato redox cellulare. In diversi modelli sperimentali, la microgravità è stata associata a una modulazione dell'attività della catena respiratoria mitocondriale, con conseguenti variazioni nella disponibilità energetica intracellulare (Grimm et al. 2020).

Parallelamente, è stato osservato un incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con attivazione di pathway di risposta allo stress ossidativo (López Garzón et al. 2025). Sebbene i ROS svolgano un ruolo fisiologico nella segnalazione cellulare, un loro accumulo può contribuire a disfunzioni cellulari e attivazione di processi apoptotici.

In risposta a queste condizioni, le cellule possono attivare meccanismi compensatori, tra cui la modulazione dei sistemi antiossidanti e la riorganizzazione dei pathway metabolici, al fine di ristabilire l'omeostasi energetica e redox.

Nel complesso, la microgravità induce una risposta integrata che coinvolge metabolismo energetico, funzione mitocondriale e regolazione dello stato ossidativo, evidenziando il ruolo centrale del metabolismo nei processi di adattamento cellulare a condizioni ambientali non fisiologiche.

1.6 Marcatori Molecolari Analizzati

Le alterazioni metaboliche e mitocondriali associate alla microgravità possono riflettersi nella modulazione dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo energetico, nella regolazione dello stress ossidativo e nei processi di adattamento cellulare. In questo contesto, l'analisi di specifici marcatori molecolari rappresenta uno strumento utile per caratterizzare le risposte cellulari a condizioni di microgravità simulata.

I marcatori considerati nel presente studio comprendono geni coinvolti nel trasporto e nel metabolismo del glucosio, nella regolazione del metabolismo lattacido, nella risposta antiossidante e nella funzione mitocondriale. In particolare, verranno approfonditi GLUT-1, LDHA, LDHB, HK1, SOD1, SOD2, PGC-1 α e MITF, in

quanto associati a pathway cellulari strettamente connessi all'omeostasi energetica e all'adattamento metabolico.

Nei paragrafi seguenti verranno descritte le principali caratteristiche biologiche e funzionali di ciascun marcatore.

1.6.1 GLUT-1: Metabolismo del glucosio

GLUT-1 (Glucose Transporter 1) è un trasportatore di membrana appartenente alla famiglia dei facilitative glucose transporters (GLUTs) responsabile dell'ingresso basale di glucosio in numerosi tipi cellulari (Mueckler & Thorens, 2013). La sua attività riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento del metabolismo energetico cellulare, determinando la disponibilità di substrato per la glicolisi e per le principali vie metaboliche energetiche.

L'espressione di GLUT-1 è modulata da diversi stimoli cellulari, tra cui ipossia, stress energetico e variazioni delle richieste metaboliche. In particolare, l'aumento dell'espressione di GLUT-1 risulta frequentemente associato a un incremento del flusso glicolitico e a processi di adattamento metabolico cellulare (Vander Heiden et al. 2009).

In questo contesto, alterazioni dell'espressione di GLUT-1 possono riflettere cambiamenti nella domanda energetica cellulare e nella riorganizzazione del metabolismo in risposta a condizioni ambientali alterate, inclusa la microgravità.

1.6.2 LDHA e LDHB: Metabolismo del lattato

Le lattato deidrogenasi A e B (LDHA e LDHB) sono isoforme enzimatiche coinvolte nella conversione reversibile del piruvato in lattato, processo fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio redox cellulare e per il supporto della glicolisi (Brooks, 2018; Valvona et al. 2016).

LDHA è prevalentemente associata alla conversione del piruvato in lattato, favorendo la rigenerazione di NAD^+ necessaria al mantenimento di un elevato flusso glicolitico. LDHB, al contrario, catalizza preferenzialmente la conversione del lattato in piruvato, supportando il metabolismo ossidativo e l'utilizzo energetico del lattato come substrato metabolico (Valvona et al. 2016).

Il rapporto funzionale tra LDHA e LDHB riflette quindi lo stato metabolico della

cellula e può indicare uno shift tra metabolismo glicolitico e metabolismo ossidativo. Alterazioni della loro espressione rappresentano pertanto un indicatore sensibile di riprogrammazione metabolica, in particolare della transizione tra strategie energetiche alternative in condizioni di stress o adattamento cellulare.

1.6.3 HK1: Fosforilazione del glucosio e regolazione della funzione mitocondriale

L'esochinasi (HK1) è un enzima ubiquitariamente espresso che catalizza il primo passaggio della glicolisi, convertendo il glucosio in glucosio-6-fosfato mediante trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP. Questa reazione rappresenta uno dei principali punti di regolazione del flusso glicolitico e costituisce uno step chiave nell'ingresso del glucosio nei principali pathway metabolici intracellulari (Wilson, 2003).

Oltre alla sua funzione catalitica, HK1 rappresenta un importante elemento di connessione tra metabolismo glicolitico e compartimento mitocondriale. L'enzima può infatti associarsi alla membrana mitocondriale esterna mediante interazione con il Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC), contribuendo all'integrazione funzionale tra produzione mitocondriale di ATP e suo utilizzo citosolico. Questo accoppiamento favorisce l'efficienza bioenergetica cellulare e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi energetica in condizioni fisiologiche e di stress metabolico (Wilson, 2003)

La localizzazione mitocondriale di HK1 è inoltre coinvolta nella modulazione della sopravvivenza cellulare. In particolare, l'interazione con VDAC contribuisce alla regolazione della permeabilità della membrana mitocondriale esterna e alla sensibilità della cellula a stimoli apoptotici in condizioni di stress energetico. In questo contesto, HK1 si configura come un elemento funzionale di integrazione tra metabolismo energetico e segnali di stress cellulare (Shoshan-Barmatz et al. 2010). In sintesi, HK1 svolge un ruolo centrale non solo nel controllo del flusso glicolitico, ma anche nel coordinamento tra metabolismo citosolico e funzione mitocondriale.

1.6.4 SOD1 e SOD2: Stresso ossidativo

Le superossido dismutasi (SOD) sono enzimi antiossidanti fondamentali nella

protezione cellulare contro lo stress ossidativo, in quanto catalizzano la conversione del radicale superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare (Murphy, 2009).

SOD1 è localizzata prevalentemente nel citosol, mentre SOD2 è presente a livello mitocondriale, dove svolge un ruolo cruciale nella difesa dai ROS generati durante la fosforilazione ossidativa (Murphy, 2009).

La modulazione dell'espressione di SOD1 e SOD2 riflette variazioni dello stato redox cellulare e dell'attività mitocondriale, rendendo questi enzimi marcatori rilevanti nello studio delle alterazioni ossidative associate a condizioni di stress cellulare, inclusa la microgravità simulata.

1.6.5 PGC-1 α : Biogenesi mitocondriale

PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) è un coattivatore trascrizionale che svolge un ruolo centrale nella regolazione della biogenesi mitocondriale e del metabolismo energetico cellulare. Attraverso l'interazione con diversi fattori trascrizionali, PGC-1 α coordina l'espressione di geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa, nel metabolismo ossidativo e nei sistemi di difesa antiossidante (Puigserver & Spiegelman, 2003).

La sua espressione viene modulata in risposta a variazioni delle richieste energetiche cellulari e a condizioni di stress metabolico, rappresentando un importante indicatore della capacità adattativa e della funzionalità mitocondriale.

1.6.6 MITF: Funzione mitocondriale

MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) è un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione di numerosi processi cellulari, tra cui proliferazione, differenziamento e metabolismo. Oltre al suo ruolo nei programmi differenziativi, MITF è stato associato alla regolazione della funzione mitocondriale e del metabolismo energetico cellulare, attraverso il controllo trascrizionale di geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale, nella fosforilazione ossidativa e nell'adattamento metabolico cellulare (Haq et al. 2013).

In particolare, MITF può promuovere programmi metabolici associati al

metabolismo ossidativo e alla funzionalità mitocondriale, suggerendo un possibile coinvolgimento nei processi di adattamento cellulare a condizioni di stress metabolico.

In questo contesto, variazioni dell'espressione di MITF possono riflettere cambiamenti nei programmi trascrizionali associati alla plasticità metabolica e all'omeostasi energetica cellulare.

1.7 Razionale dello Studio

Alla luce delle evidenze riportate, la microgravità emerge come una condizione in grado di influenzare profondamente l'organizzazione cellulare e la regolazione dei pathway metabolici, attraverso un'interazione complessa tra segnali meccanici, funzione mitocondriale e omeostasi energetica.

In particolare, le alterazioni della dinamica mitocondriale, della produzione di ATP e dello stato redox suggeriscono che il metabolismo cellulare rappresenti uno dei principali sistemi coinvolti nei processi di adattamento alla microgravità reale o simulata.

In questo contesto, l'analisi di marcatori associati al metabolismo glicolitico, con particolare riferimento all'ingresso del glucosio (GLUT1), alla sua fosforilazione (HK1), al metabolismo del lattato (LDHA e LDHB), alla risposta allo stress ossidativo (SOD1 e SOD2) e alla regolazione della funzione mitocondriale e della biogenesi mitocondriale (PGC-1 α e MITF), può fornire informazioni rilevanti sui meccanismi cellulari coinvolti nell'adattamento metabolico indotto dalla microgravità simulata.

Sulla base di queste considerazioni, il presente studio si propone di investigare gli effetti della microgravità simulata su cellule HEK, con particolare attenzione alle modificazioni della funzione mitocondriale, del metabolismo energetico e dell'espressione di geni coinvolti nella regolazione metabolica.

2. MATERIALI E METODI

In questo studio sono state utilizzate cellule della linea HEK293 per l'analisi degli effetti della microgravità simulata sul metabolismo cellulare e sulla funzione mitocondriale. Le cellule di tutte le condizioni sperimentali sono state coltivate in condizioni di coltura standard ed in terreno DMEM. Sono state considerate tre condizioni sperimentali:

- Controllo statico
- Microgravità simulata 24 ore
- Microgravità simulata 7 giorni

Le cellule sono state successivamente analizzate mediante approcci molecolari, biochimici e di imaging, al fine di caratterizzare le principali alterazioni metaboliche indotte dall'esposizione a microgravità simulata.

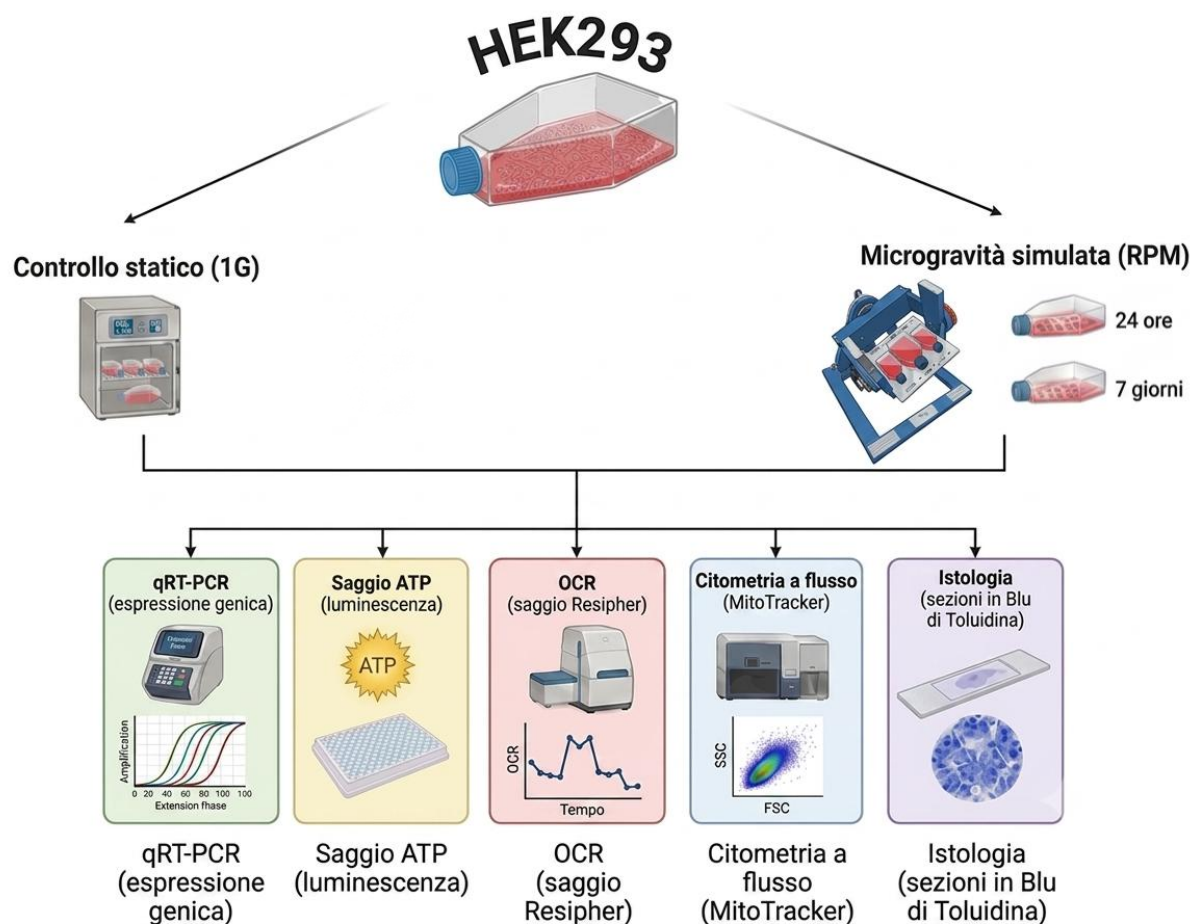


Figura 2: Schema sperimentale delle cellule HEK293: condizioni di controllo (1g) e microgravità simulata mediante Random Positioning Machine (RPM), con relative analisi effettuate. Immagine realizzata con [BioRender.com](https://www.biorender.com/).

2.1 Modello Cellulare HEK293

Le cellule HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) sono una linea cellulare umana immortalizzata, derivata da cellule renali embrionali umane trasformate mediante l'integrazione di sequenze genomiche dell'adenovirus umano di tipo 5 (Graham et al. 1977). Si tratta di una linea cellulare ampiamente utilizzata negli studi di biologia cellulare e molecolare per la loro elevata stabilità e facilità di coltura.

La linea cellulare è stata amplificata in terreno DMEM supplementato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum) e 1% di penicillina-streptomicina (PS). Le cellule sono state mantenute in flask da 75 cm² a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e sono state diluite per favorirne la crescita, sostituendo il terreno esausto con terreno nuovo ad ogni passaggio.

Come controllo sperimentale sono state utilizzate cellule HEK293 cresciute in condizioni statiche (1g) utilizzato come “controllo a terra”.

L'esposizione alla microgravità simulata è stata effettuata mediante un sistema di tipo Random Positioning Machine (RPM, Airbus Defence and Space; Netherlands), progettato per applicazioni di laboratorio e in grado di simulare condizioni di microgravità attraverso il continuo riorientamento del campione rispetto al vettore gravitazionale.

Per ridurre possibili effetti confondenti legati a shear stress e accelerazioni centrifughe, le flask di coltura sono state posizionate il più possibile vicino al centro di rotazione e completamente riempite di terreno per minimizzare la formazione di bolle d'aria.

Per garantire la riproducibilità sperimentale e limitare eventuali variazioni associate al posizionamento dei campioni all'interno del dispositivo RPM, tutte le flask sono state collocate nel medesimo alloggiamento per ciascun esperimento.

Tutte le condizioni sperimentali sono state eseguite in triplicato biologico.

2.2 Estrazione RNA e RT-qPCR

Al termine dei trattamenti sperimentali, le cellule HEK293 sono state raccolte e sottoposte a estrazione dell'RNA totale mediante kit PureLink® RNA Mini (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), secondo le istruzioni del produttore.

Il protocollo prevedeva una fase iniziale di lisi cellulare e omogeneizzazione del campione in presenza di buffer contenente isotiocianato di guanidinio e 2-mercaptoetanololo, al fine di preservare l'integrità dell'RNA e inattivare le RNasi endogene. Successivamente, dopo aggiunta di etanolo, i campioni sono stati caricati su colonnine con membrana in silice per la purificazione dell'RNA totale. Dopo lavaggi sequenziali, l'RNA è stato eluito in acqua RNasi-free.

La concentrazione dell'RNA estratto sono state valutate prima della successiva fase di retrotrascrizione.

RNA 0.2µg/campione	LETTURA RNA µg/µL
Campione 1 -24h	0.060319
Campione 2 -24h	0.0315449
Campione 3 -24h	0.09256
Campione 1 -7gg	0.0144144
Campione 2 -7gg	0.0144144
Campione 3 -7gg	0.010767
Campione 1 -CNT	0.0227577
Campione 2 -CNT	0.07085
Campione 3 -CNT	0.200498

Tabella 1. Concentrazione dell'RNA totale estratto nei tre replicati biologici delle condizioni Controllo (CNT), 24 h e 7 giorni.

La sintesi di cDNA è stata effettuata mediante kit ImProm-II® Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). L'RNA totale è stato incubato con primer secondo il protocollo del produttore e sottoposto a retrotrascrizione mediante termociclatore, ottenendo cDNA successivamente utilizzato per le analisi di espressione genica.

L'analisi dell'espressione genica di *GLUT-1*, *HK1*, *LDHA*, *LDHB*, *SOD1*, *SOD2*, *PGC-1α* e *MITF* è stata eseguita mediante quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) utilizzando iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Segrate, Milano, Italia).

Le reazioni sono state allestite in piastre multiwell da 96 pozzetti con volume finale di 20 µL contenenti SYBR® Green Supermix, primer forward e reverse specifici e

cDNA. Le sequenze dei primer utilizzati sono presenti in Tabella 2.

GENI	FORWARD	REVERSE
<i>GLUT1</i>	5'-TTGCAGGCTTCTCCAACCTGGAC-3'	5'-CAGAACCAGGAGCACAGTGAAG-3'
<i>SOD1</i>	5'-CTCACTCTCAGGAGACCATTGC-3'	5'-CCACAAGCCAAACGACTTCCAG-3'
<i>SOD2</i>	5'-CTGGACAAACCTCAGCCCTAAC-3'	5'-AACCTGAGCCTTGGACACCAAC-3'
<i>PGC1-α</i>	5'-CCAAAGGATGCGCTCTCGTTCA-3'	5'-CGGTGTCTGTAGTGGCTTGACT-3'
<i>MITF</i>	5'-GGCTTGATGGATCCTGCTTTGC-3'	5'-GAAGGTTGGCTGGACAGGAGTT-3'
<i>LDHA</i>	5'-GGATCTCCAACATGGCAGCCTT-3'	5'-AGACGGCTTTCTCCCTCTTGCT-3'
<i>LDHB</i>	5'-GGACAAGTTGGTATGGCGTGTG-3'	5'-AAGTCCCATGCTGCAGATCCA-3'
<i>HK1</i>	5'-CTGCTGGTGAAAATCCGTAGTGG-3'	5'-GTCCAAGAAGTCAGAGATGCAGG-3'
<i>TBP</i>	5'-GTGACCCAGCATCACTGTTTC-3'	5'-GCAAACCAGAAACCCTTGCG-3'

Tabella 2. Sequenze dei primer forward e reverse utilizzati per analisi RT-qPCR.

L'amplificazione è stata eseguita mediante termociclatore T100 Bio-Rad. Il campione è stato addizionato ai primer sperimentali, quindi la miscela è stata denaturata a 70°C per 5 minuti e poi raffreddata su ghiaccio; successivamente è stata aggiunta la mix contenente acqua nucleasi-free, buffer di reazione, trascrittasi inversa, cloruro di magnesio, dNTPs e inibitori delle ribonucleasi. Si verifica una prima fase di annealing a 25°C per 5 minuti, quindi la reazione si fa proseguire a 42°C per 1 ora e il campione è subito pronto per essere amplificato tramite RT-qPCR. Per ciascun campione sono stati eseguiti triplicati tecnici. L'espressione relativa dei geni target è stata normalizzata utilizzando il gene TATA BOX (TBP) come controllo endogeno. I livelli di espressione relativa sono stati calcolati mediante metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, confrontando i campioni esposti a microgravità simulata con i rispettivi controlli mantenuti in condizioni statiche (1g).

2.3 Citofluorimetria (MitoTracker®)

Per la valutazione delle alterazioni mitocondriali indotte dalla microgravità simulata, le cellule HEK293 sono state analizzate mediante citofluorimetria utilizzando la sonda fluorescente MitoTracker® Green FM (Thermo Fisher Scientific), secondo le indicazioni del produttore.

La sonda, permeabile alla membrana cellulare, si diffonde nel citoplasma e si

accumula nei mitocondri metabolicamente attivi, consentendo la valutazione della funzionalità mitocondriale mediante analisi citofluorimetrica.

Al termine delle condizioni sperimentali, le cellule sono state recuperate dalle flask di coltura, trasferite in Falcon, centrifugate 1100 rpm per 5 minuti, lavate con PBS 1X, centrifugate nuovamente 1100 rpm per 5 minuti e risospese in tampone fosfato. La sospensione cellulare è stata contata mediante l'utilizzo di una camera di conta di Bürker. Per ogni condizione sperimentale e replicato tecnico realizzato sono state collezionate 1×10^6 cellule.

I campioni sono stati incubati con 1 μ L del colorante fluorescente MitoTracker® 30 minuti a 37°C, in condizioni protette dalla luce. Nei campioni di controllo negativo il colorante non è stato aggiunto.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati acquisiti mediante citofluorimetro. Le popolazioni cellulari di interesse sono state selezionate attraverso gating morfologico basato sui parametri Forward Scatter (FSC), correlato alle dimensioni cellulari, e Side Scatter (SSC), correlato alla complessità interna cellulare, escludendo dall'analisi detriti cellulari e aggregati.

I dati ottenuti sono stati elaborati mediante software dedicato - Floreada - e analizzati valutando le variazioni dell'intensità di fluorescenza in scala logaritmica (MFI, Mean Fluorescence Intensity), utilizzata come parametro quantitativo per confrontare le variazioni del contenuto mitocondriale tra le diverse condizioni sperimentali.

2.4 Quantificazione ATP

La quantificazione dell'ATP intracellulare è stata effettuata mediante il saggio bioluminescente CellTiter-Glo® 3D Cell Viability (Promega), secondo le istruzioni del produttore.

Il metodo si basa su una reazione luciferina/luciferasi che genera un segnale luminescente proporzionale alla quantità di ATP presente nel campione e, indirettamente, all'attività metabolica cellulare. Il reagente CellTiter-Glo® determina contemporaneamente la lisi cellulare e il rilascio dell'ATP intracellulare.

Al termine dei trattamenti sperimentali, le cellule sono state incubate con il reagente

CellTiter-Glo® in rapporto 1:1 rispetto al volume del terreno di coltura presente nei pozzetti. Nello specifico gli sferoidi formati successivamente all'esposizione a microgravità simulata sono stati dissociati mediante il trattamento con l'enzima di dissociazione Tripsina/ EDTA (Trypsin 0.25 %, EDTA 1mm HBSS senza Ca^{2+} , senza Mg^{2+} , Biosigma). Le cellule sono state contate mediante l'utilizzo di una camera di Bürker e piastrate all'interno di una piastra bianca a fondo piatto multipozzetto ad una densità pari a $156 \cdot 250$ cellule/cm² in 30 µL di terreno completo (DMEM addizionato con 10% di siero fetale bovino e 1% penicillina/streptomycin). I campioni sono stati mantenuti in agitazione per 25 minuti per favorire la completa lisi cellulare ed incubati a temperatura ambiente per stabilizzare il segnale luminescente. Alcuni pozzetti della piastra multipozzetto sono stati dedicati alla creazione di un bianco, formato da un rapporto 1:1 terreno di crescita e reagente del kit CellTiter-Glo® 3D Cell Viability (Promega), senza la presenza di cellule.

La luminescenza è stata misurata mediante microplate reader Varioskan® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al bianco e al rispettivo controllo mantenuto in condizioni statiche (1g).

2.5 Analisi del Consumo di Ossigeno

La funzionalità mitocondriale delle cellule HEK293 esposte a microgravità simulata è stata valutata mediante analisi del consumo di ossigeno cellulare (OCR, Oxygen Consumption Rate), parametro indicativo dell'attività respiratoria mitocondriale e della fosforilazione ossidativa.

Dopo l'esposizione della linea cellulare HEK293 a 24 ore e 7 giorni di microgravità simulata, gli sferoidi formati sono stati raccolti all'interno di Falcon, centrifugati 1100 rpm per 5 minuti, lavati con PBS 1X, nuovamente centrifugati 1100 rpm per 5 minuti, successivamente sono stati dissociati mediante il trattamento con l'enzima di dissociazione Tripsina/ EDTA (Trypsin 0.25 %, EDTA 1mm HBSS senza Ca^{2+} , senza Mg^{2+} , Biosigma). Il quantitativo di cellule per ogni condizione sperimentale è stato contato mediante l'utilizzo di una camera di Bürker. Le cellule sono state seminate alle densità di $62 \cdot 500$ cellule/cm² in 100 µL, centrifugate 900 rcf per 5 minuti e poi

lasciate aderire a 37°C e 5 % di CO₂ per 5 ore. L'analisi è stata eseguita mediante il sistema Resipher (Lucid Scientific Atlanta, GA) dotato di una matrice a 32 sensori (NS32-101A, Lucid Scientific), questo è stato posizionato sulla piastra multipozzetto e le acquisizioni di consumo di ossigeno sono state eseguite in modo continuo per 48 ore. I valori ottenuti dall'analisi OCR sono stati successivamente normalizzati rispetto alle misurazioni di assorbanza (OD) relativi al saggio di quantificazione proteica Bradford.

2.6 Inclusione in Resina

Al termine dell'esposizione alla microgravità simulata, gli sferoidi di HEK293 ottenuti dalle diverse condizioni sperimentali (24h e 7 giorni) sono stati raccolti e processati per l'inclusione in resina Technovit 8100, Bio Optica, al fine di effettuare analisi morfologiche su sezioni semifini.

Per aumentare la rappresentatività sperimentale e ottenere un numero adeguato di sezioni analizzabili, sono stati inclusi complessivamente 10 campioni relativi alle condizioni sperimentali a 24h e 10 campioni relativi alle condizioni a 7 giorni.

Dopo sedimentazione spontanea, gli sferoidi sono stati lavati in PBS e fissati in formaldeide al 4% per 40 minuti a 4°C. Terminata la fissazione, i campioni sono stati sottoposti a ulteriori lavaggi di PBS e acqua distillata, al fine di rimuovere eventuali residui che avrebbero potuto interferire con le successive fasi di inclusione.

Per preservare l'integrità strutturale e l'organizzazione tridimensionale degli sferoidi durante la processazione, i campioni sono stati inclusi in agarosio a basso punto di fusione (4%, BRL 5517UB), lasciati polimerizzare a 4°C e successivamente sono stati sottoposti a disidratazione in acetone e infiltrazione graduale in resina Technovit 8100, Bio Optica, fino a completa impregnazione del campione. L'inclusione finale è stata effettuata in capsule BEEM, seguita dalla polimerizzazione della resina secondo le indicazioni del produttore.

I blocchetti di resina ottenuti (dieci per le 24h e dieci per i 7 giorni) sono stati sezionati mediante microtomo Ultracut UCT, Leica, ottenendo sezioni semifini dello spessore di 2 µm, raccolte su vetrini SuperFrost preventivamente trattati con albumina glicerinata (1:100) per favorire l'adesione del campione al supporto.

Al fine di garantire una maggiore rappresentatività delle osservazioni sperimentali, per ciascuna condizione temporale sono stati selezionati quattro blocchetti di resina. Da ciascun blocchetto sono stati ottenuti quattro vetrini distinti contenenti almeno sei sezioni semifini, successivamente utilizzate per le analisi morfometriche e strutturali degli sferoidi.

Per la valutazione morfologica generale, le sezioni sono state colorate con Blu di Toluidina 1% in soluzione acquosa con Borace 1% e sono state osservate mediante microscopia ottica al fine di valutarne l'organizzazione strutturale, le dimensioni e

l'eventuale presenza di alterazioni morfologiche associate all'esposizione alla microgravità simulata.

2.7 Acquisizione delle Immagini mediante Microscopia Ottica

L'osservazione dei campioni su vetrino è stata effettuata mediante microscopia ottica invertita utilizzando due diversi sistemi Zeiss, selezionati in base alle esigenze sperimentali.

Per l'acquisizione delle immagini in luce trasmessa è stato impiegato un microscopio ottico invertito Axiovert 100M (Zeiss), equipaggiato di un sistema di acquisizione immagini costituito da una camera digitale monocromatica AxioCam MRM (1.4 megapixel) collegata ad un computer dotato di software AxioVision, versione 4.6.3, utilizzato per l'elaborazione delle immagini.

Le osservazioni sono state effettuate utilizzando l'obiettivo A-Plan 5x (NA 0.12) e Plan-Neofluar 10x (NA 0.30). Le immagini ottenute sono state salvate in formato .tiff (1388 x 1040 pixel).

Per le acquisizioni ad elevato ingrandimento è stato utilizzato un microscopio ottico invertito Axio Observer Z1 (Zeiss), controllato tramite il software ZEN Blue 2.6 e dotato di camera digitale a colori AxioCam 105 (5 megapixel). Le immagini sono state acquisite mediante obiettivi EC Plan-Neofluar 20x (NA 0.50) e 40x Oil (NA 1.30) e salvate in formato .tiff (1920x1920 pixel).

2.8 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica quantitativa. I risultati sono stati espressi come media $\pm$ errore standard della media.

I gruppi indipendenti con distribuzione gaussiana sono stati confrontati mediante il test t di Student non appaiato, mentre nei casi di distribuzione non gaussiana è stato utilizzato il test U di Mann–Whitney.

Le analisi comparative sono state effettuate confrontando i campioni esposti a microgravità simulata con i rispettivi controlli statici (1g) ai differenti tempi sperimentali. Un valore di $p \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3. SCOPO DEL LAVORO

L'esposizione a condizioni di microgravità, reale o simulata, è associata a profonde alterazioni delle funzioni cellulari, coinvolgendo processi strutturali, metabolici e mitocondriali (Grimm et al. 2020; van den Nieuwenhof et al. 2024; López Garzón et al. 2025).

In particolare, numerose evidenze suggeriscono che la microgravità possa influenzare il metabolismo energetico cellulare, modulando la funzione mitocondriale, la produzione di ATP e la regolazione dello stato redox (Grimm et al. 2020; van den Nieuwenhof et al. 2024), processi strettamente associati alla funzionalità della catena respiratoria mitocondriale e alla produzione di ROS (Brand & Nicholls, 2011; Murphy, 2009).

Tali processi risultano strettamente connessi all'attività della catena respiratoria mitocondriale e alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che svolgono un ruolo centrale nella regolazione dell'adattamento cellulare e della risposta allo stress (Brand & Nicholls, 2011; Murphy, 2009). Parallelamente, le alterazioni citoscheletriche e dei meccanismi di meccano-trasduzione indotte dalla microgravità possono influenzare la dinamica e la funzionalità mitocondriale, suggerendo una stretta integrazione tra segnali meccanici e regolazione metabolica cellulare (Ingber, 2003; Uzer et al. 2015).

Nonostante i progressi compiuti negli ultimi anni, i meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nell'adattamento metabolico alla microgravità risultano ancora non completamente chiariti, soprattutto in relazione all'integrazione tra metabolismo glicolitico, funzione mitocondriale e risposta ossidativa.

Alla luce di queste considerazioni, il presente studio si propone di analizzare gli effetti della microgravità simulata su cellule HEK293, mediante esposizione a Random Positioning Machine (RPM), come modello sperimentale di microgravità simulata.

In particolare, il lavoro è finalizzato a:

- valutare le modificazioni della funzione mitocondriale e del metabolismo energetico cellulare;

- analizzare eventuali alterazioni della produzione di ATP e della respirazione cellulare;
- investigare l'espressione di marcatori molecolari coinvolti nel metabolismo glicolitico, nella regolazione del metabolismo lattacido, nella risposta antiossidante e nella biogenesi mitocondriale;
- caratterizzare le risposte cellulari associate all'adattamento metabolico in condizioni di microgravità simulata.

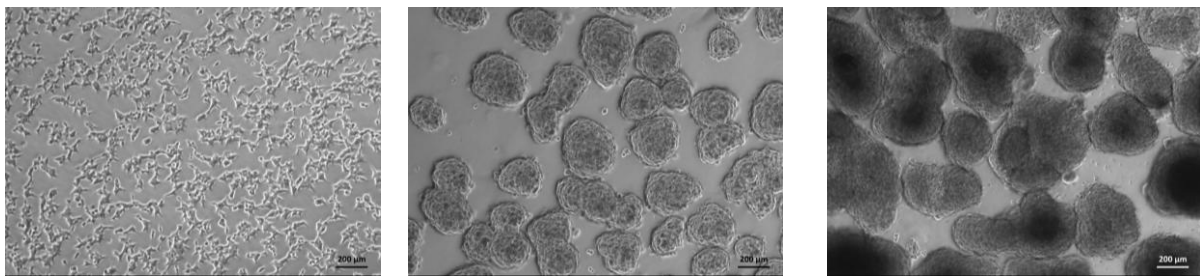
Nel complesso, lo studio mira a contribuire alla comprensione dei meccanismi attraverso cui la microgravità influenza il metabolismo cellulare e la funzione mitocondriale, fornendo ulteriori evidenze sui processi di adattamento cellulare a condizioni ambientali non fisiologiche.

4. RISULTATI

Per valutare gli effetti della microgravità simulata sulle cellule HEK293 sono state eseguite analisi morfologiche, molecolari e funzionali. In particolare, sono stati valutati i cambiamenti morfologici indotti dall'esposizione alla microgravità simulata, l'espressione di geni coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico e della funzione mitocondriale, il contenuto mitocondriale mediante citofluorimetria, il contenuto relativo di ATP e la respirazione cellulare attraverso l'analisi del consumo di ossigeno (OCR).

4.1 Alterazioni Morfologiche indotte dalla Microgravità Simulata

Per valutare l'effetto della microgravità simulata sulla morfologia cellulare, le cellule HEK293 sono state osservate mediante microscopia ottica a contrasto di fase dopo 24 ore e 7 giorni di esposizione al Random Positioning Machine (RPM), confrontandole con i rispettivi controlli statici (1g) (Figura 3).



(A) HEK 1G obiettivo 5x

(B) HEK μ G 24h obiettivo 5x

(C) HEK μ G 7 giorni obiettivo 5x

Figura 3: Immagini rappresentative delle cellule HEK293 osservate mediante microscopia ottica a contrasto di fase. (A) Controllo mantenuto in condizioni statiche (1g); (B) cellule esposte a microgravità simulata per 24 ore; (C) cellule esposte a microgravità simulata per 7 giorni.

Le cellule mantenute in condizioni di controllo (1g) mostrano la tipica morfologia appiattita e aderente al substrato, con distribuzione omogenea sul fondo della flask.

Dopo 24 ore di esposizione alla microgravità simulata si osservavano iniziali modificazioni morfologiche, caratterizzate da una riduzione dell'adesione cellulare e

dalla comparsa di piccoli aggregati cellulari.

L'esposizione protratta per 7 giorni determina un incremento della formazione di aggregati tridimensionali (sferoidi), accompagnato da una riduzione delle cellule aderenti rispetto alla condizione di controllo.

4.2 Riprogrammazione Metabolica indotta dalla Microgravità Simulata

Per valutare l'effetto della microgravità simulata sul metabolismo glicolitico è stata analizzata mediante RT-qPCR l'espressione di alcuni geni chiave: *GLUT1*, *HK1*, *LDHA* e *LDHB* (Figura 4).

GLUT1 rappresenta il principale trasportatore coinvolto nell'uptake cellulare di glucosio in molti tessuti (Vulturar, R. et al. 2022).

HK1 (esochinasi 1) è un enzima espresso in modo ubiquitario in tutti i tessuti dei mammiferi, con livelli particolarmente elevati nel cervello e negli eritrociti, dove sostiene il metabolismo basale del glucosio. Strutturalmente presenta una dimensione di circa 100 kDa ed è composta da due domini omologhi (N-terminale e C-terminale); a differenza di altre varianti, il suo dominio N-terminale è cataliticamente inattivo e ricopre un ruolo esclusivamente regolatorio. Oltre alla sua funzione metabolica primaria nel citosol, ossia la fosforilazione del glucosio in glucosio-6-fosfato (G6P), l'esochinasi 1 è nota per la sua capacità di ancorarsi alla membrana mitocondriale esterna tramite un dominio di legame specifico situato all'estremità N-terminale. Una volta posizionata sulla membrana, la HK1 interagisce direttamente con il canale anionico voltaggio-dipendente (VDAC). Questo legame mitocondriale non solo ottimizza i flussi bioenergetici cellulari, ma esercita anche un fondamentale ruolo anti-apoptotico e protettivo (in particolare nei neuroni): la presenza di HK1 mitocondriale impedisce l'azione di fattori pro-apoptotici come BAX e BAK, prevenendo la permeabilizzazione della membrana e la conseguente morte della cellula. Il distacco o la riduzione della HK1 dai mitocondri, che può avvenire a causa di specifiche modificazioni post-traduzionali o stress ambientali, è infatti associato a disfunzioni metaboliche e a processi patologici legati all'invecchiamento e alla neurodegenerazione (Pesce, et al. 2025).

Sono stati analizzati anche i geni per LDHA e LDHB. La lattato deidrogenasi (LDH) è un enzima tetramerico chiave nel metabolismo energetico cellulare, deputato a catalizzare la reazione reversibile di interconversione tra piruvato e lattato, accoppiata alla ossidoriduzione dei cofattori nicotinammidici NADH e NAD⁺.

In condizioni fisiologiche, l'isoforma LDHA è prevalentemente espressa in tessuti caratterizzati da un attivo metabolismo glicolitico, quali il muscolo scheletrico e il fegato. Dal punto di vista cinetico, LDHA mostra un'elevata affinità per il piruvato, promuovendone la riduzione a lattato; tale via biochimica è fondamentale in condizioni di ipossia temporanea o durante uno sforzo muscolare intenso, in quanto consente il rapido ripristino del pool citosolico di NAD⁺, garantendo la continuità del flusso glicolitico anaerobico. Al contrario, l'isoforma LDHB è abbondantemente espressa nei tessuti altamente ossidativi e a elevata domanda energetica, come il miocardio e il tessuto cerebrale. LDHB catalizza preferenzialmente la reazione opposta, ovvero l'ossidazione del lattato a piruvato, consentendo a tali organi di captare il lattato sistemico circolante e di metabolizzarlo come substrato energetico primario da incanalare nel ciclo dei acidi tricarbossilici (TCA) e nella fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXPHOS) (Shibata et al. 2021; El Khoury et al. 2025).

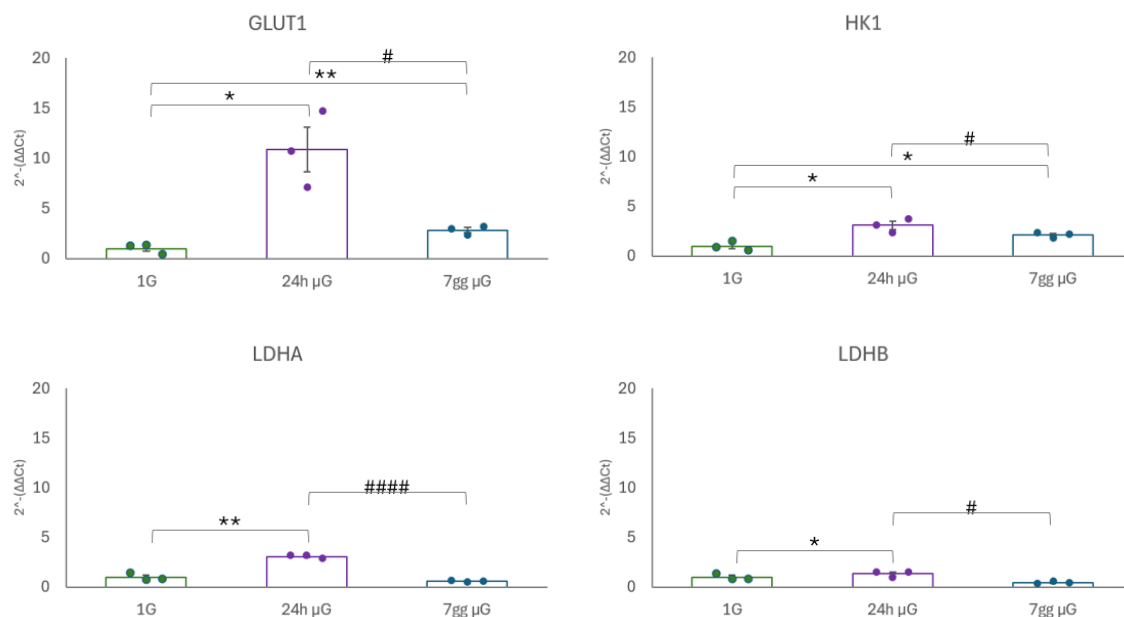


Figura 4: Espressione genica di geni chiave regolatori del metabolismo glicolitico e del lattato (*GLUT1*, *HK1*, *LDHA*, *LDHB*). I risultati sono espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. I dati sono stati analizzati mediante Unpaired Student's t-test: * $p < 0.05$ HEK293 1G vs 24h μG e 24h μG vs 7 giorni μG ; ** $p < 0.01$ 24h μG vs 7 giorni μG ; # $p > 0.05$ 24h μG vs 7 giorni μG ; #### $p > 0.001$ 24h μG vs 7 giorni μG , $n = 3$.

Successivamente all'esposizione a microgravità simulata l'espressione di *GLUT1* risultava significativamente aumentata dopo 24 ore di esposizione alla microgravità simulata (* $p < 0.05$) rispetto al controllo mantenuto in condizioni statiche. Dopo 7 giorni i livelli di espressione risultavano statisticamente ridotti rispetto alle 24 ore (# $p < 0.05$), mostravano, comunque, un aumento significativo rispetto al controllo statico (** $p < 0.01$).

Analogamente, *HK1* mostrava un incremento significativo a 24 ore (* $p < 0.05$), seguito da una riduzione dopo 7 giorni (# $p < 0.05$) e, come per l'espressione di *GLUT1*, mantenendo comunque livelli di espressione superiori rispetto al controllo statico (* $p < 0.05$).

Per quanto riguarda i geni per *LDHA* e *LDHB*, ciò che osserviamo è un loro aumento di espressione, statisticamente significativo, durante le prime 24 ore di esposizione

alla microgravità simulata (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$), con una successiva down-regolazione, tornando ai livelli di espressione pari al controllo, al finire dei 7 giorni di esposizione alla microgravità simulata.

Complessivamente, i risultati evidenziano una risposta precoce dei geni coinvolti nel metabolismo glicolitico in seguito all'esposizione alla microgravità simulata, seguita da una riduzione dell'espressione dopo esposizioni prolungate, in alcuni casi come per *LDHA* e *LDHB*, tornando all'espressione basale delle cellule statiche di controllo. Per approfondire gli effetti della microgravità simulata sulla funzione mitocondriale e sulla risposta allo stress ossidativo, è stata analizzata l'espressione dei geni *SOD1*, *SOD2*, *PGC-1 α* e *MITF* (Figura 5).

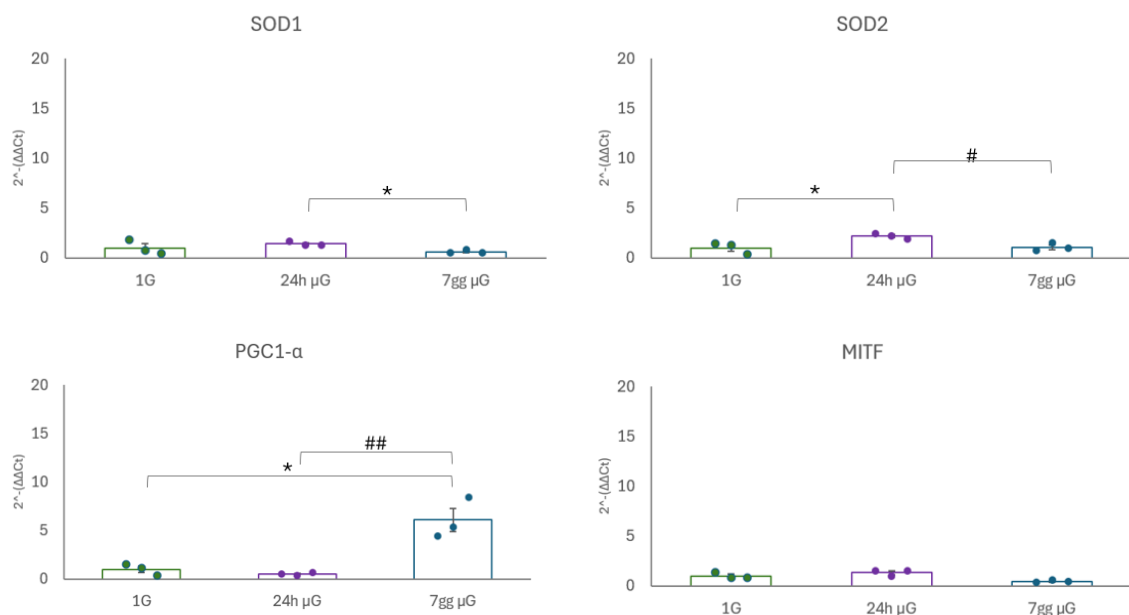


Figura 5: Espressione genica dei principali enzimi di difesa contro le specie reattive dell'ossigeno (*SOD1* e *SOD2*), e i fattori *PGC1- α* e *MITF*, che agiscono come interruttori maestri per la biogenesi mitocondriale e lo sviluppo cellulare. I risultati sono espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. I dati sono presentati come Media $\pm$ SEM. I dati sono stati analizzati mediante Unpaired Student's t-test: * $p < 0.05$ HEK293 1G vs 24h μ G e 24h μ G vs 7 giorni μ G; # $p > 0.05$ 24h μ G vs 7 giorni μ G, $n = 3$.

Le superossido dismutasi 1 (SOD1) e 2 (SOD2) sono metalloenzimi antiossidanti che costituiscono la prima linea di difesa cellulare contro lo stress ossidativo, deputati a

convertire i radicali superossido in ossigeno e perossido di idrogeno. Il loro meccanismo d'azione si basa su un ciclo sequenziale di ossidoriduzione del metallo presente nel sito attivo, il quale capta ed eleva elettroni da due molecole successive di superossido per neutralizzarle. Strutturalmente si differenziano per compartimentalizzazione e cofattori: la SOD1 è un omodimero a rame/zinco localizzato principalmente nel citosol e nel nucleo, mentre la SOD2 è un tetramero a manganese situato esclusivamente nella matrice mitocondriale per proteggere l'organello dai ROS della respirazione cellulare (Anwar et al. 2025).

L'espressione di *SOD1* non subisce modifiche statisticamente significative nelle prime 24 ore di esposizione alla microgravità simulata. Si può apprezzare, però, una down-regolazione statisticamente significativa tra le 24 ore di esposizione e i 7 giorni di esposizione, riportando i livelli di espressione genica pari a quelli del controllo statico a terra. Per quanto riguarda l'espressione genica di SOD2 si può apprezzare una up-regolazione significativa nella condizione di esposizione a microgravità di 24 ore rispetto al controllo statico; e, come per l'espressione di SOD1, è presente una down-regolazione a 7 giorni di esposizione con il ritorno ad una condizione di espressione uguale a quella del controllo statico.

È stato successivamente analizzato anche il gene per PGC1- α , un regolatore trascrizionale pleiotropico che ricopre un ruolo centrale nel coordinamento del metabolismo energetico sistemico e cellulare.

Fortemente indotto da stimoli ambientali e fisiologici come l'esposizione al freddo, il digiuno e l'esercizio fisico, PGC1- α non si lega direttamente al DNA, ma interagisce con specifici fattori di trascrizione per potenziarne l'attività genica. (Liang & Ward, 2006).

L'analisi in RT-qPCR ci mostra un marcato incremento dell'espressione nelle cellule esposte alla microgravità simulata per 7 giorni rispetto sia al controllo sia alla condizione a 24 ore.

Infine, è stato analizzato il gene per MITF il quale non mostrava variazioni rilevanti tra le differenti condizioni sperimentali.

Nel complesso, l'analisi dell'espressione genica evidenzia variazioni nei livelli trascrizionali dei geni coinvolti nel metabolismo glicolitico, nella risposta allo stress

ossidativo e nella regolazione della funzione mitocondriale nelle cellule HEK293 esposte a microgravità simulata.

4.3 Valutazione del Contenuto Mitocondriale mediante Citofluorimetria

Per valutare nel complesso la massa mitocondriale presente all'interno delle cellule HEK293 nelle condizioni di controllo (statico), 24 ore e 7 giorni di esposizione alla condizione di microgravità simulata, le cellule relative alle tre condizioni sperimentali sono state analizzate mediante analisi citofluorimetrica successivamente alla marcatura con MitoTracker Green. Questa analisi ha evidenziato due caratteristiche principali: la percentuale di cellule MitoTracker positive e la media geometrica dell'intensità di fluorescenza in scala logaritmica (MFI).

I risultati visualizzabili in Figura 6 A evidenziano un aumento statisticamente significativo tra la condizione di controllo statico e la breve esposizione alla microgravità simulata di 24 ore; inoltre, rispetto alle 24 ore di esposizione vi è un ulteriore aumento della percentuale di positività al MitoTracker nei 7 giorni di esposizione a microgravità simulata. Tuttavia, questo andamento non è riconoscibile nel grafico rappresentante l'intensità media di fluorescenza (Figura 6 B), dove non si apprezza nessuna differenza statistica nelle condizioni di esposizione alla microgravità rispetto al controllo statico.

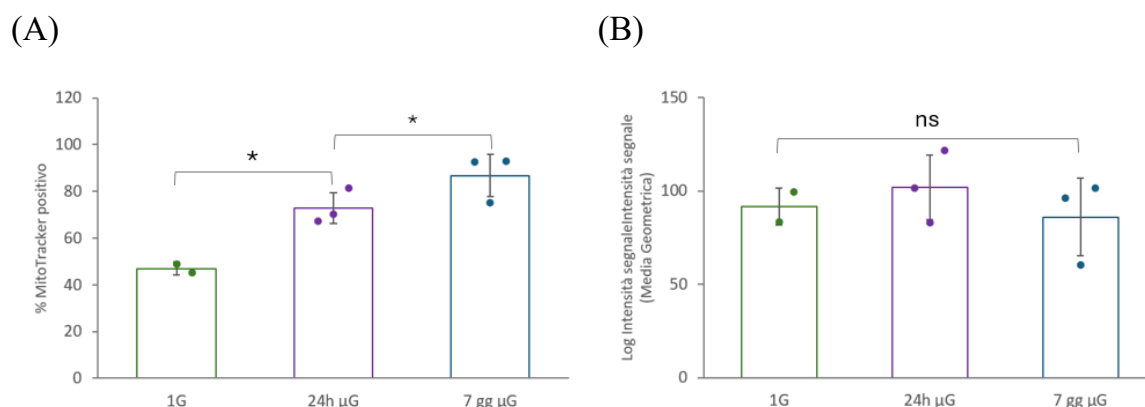


Figura 6: **A:** Quantificazione della percentuale di cellule MitoTracker positive. Si osserva un aumento significativo nella condizione SMG rispetto al controllo 1G. **B:** Analisi della Media geometrica dell'Intensità logaritmica della Fluorescenza (MFI). Non si registrano variazioni significative nell'intensità media per singola cellula. I dati sono presentati come Media $\pm$ SEM. I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo di Unpaired Student's t-test: * $p < 0.05$ HEK293 1G vs 24h μ G; n.s.=non significativo, 24h e 7 giorni μ G n=3, 1G n=2.

4.4 Valutazione del Contenuto di ATP

In seguito ai risultati ottenuti grazie all'analisi di RT-qPCR e di percentuale di positività a MitoTracker, precedentemente illustrate, si è deciso di andare a valutare il contenuto di ATP presente nelle cellule HEK293 post esposizione a microgravità simulata nelle due tempistiche già indicate. Per eseguire questa analisi sulle cellule di controllo statiche e gli sferoidi derivanti dall'esposizione a SMG è stato utilizzato il kit CellTiter-Glo 3D (Promega) (Forghani et al. 2024).

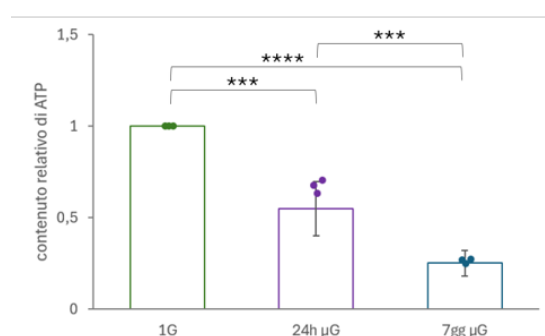


Figura 7: Gli sferoidi di HEK293 sono stati dissociati e successivamente le singole cellule piastrate in una piastra bianca a 96 pozzetti a fondo piatto; successivamente è stato analizzato

il contenuto di ATP per ogni condizione mediante l'utilizzo del kit di vitalità cellulare CellTiter-Glo 3D. I dati sono presentati come Media $\pm$ SEM. I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo di Unpaired Student's t-test: *** $p < 0.001$ HEK293 1G vs 24h μ G e 24h μ G vs 7 giorni μ G, **** $p < 0.0001$ 1G vs 24h μ G, per tutte le condizioni $n=3$.

I risultati ottenuti mostrano una significativa riduzione del contenuto di ATP nelle cellule esposte a microgravità simulata per 24 ore rispetto al controllo (*** $p < 0.001$). Lo stesso andamento è visibile anche nel gruppo sperimentale relativo all'esposizione di 7 giorni a microgravità simulata (**** $p < 0.0001$). Inoltre, è apprezzabile una diminuzione di contenuto relativo di ATP nelle cellule HEK293 esposte a 7 giorni di microgravità simulata rispetto a quelle esposte per una tempistica minore (24 ore) (Figura 7).

4.5 Analisi del Consumo di Ossigeno (OCR)

Per chiarire ulteriormente gli effetti relativi all'esposizione alla microgravità simulata a due tempistiche, di cellule HEK293, è stato valutato il loro consumo di ossigeno (OCR). Prima delle analisi gli sferoidi sono stati dissociati e le singole cellule sono state piastrate nei pozzetti di una piastra multipozzetto per la successiva analisi. Per apprezzare correttamente le possibili alterazioni dovute alla microgravità simulata la lettura del consumo di ossigeno è stata eseguita per una durata totale di 48 ore, come visibile nel grafico riportato in Figura 8. Ciò che si evince dall'analisi è una diminuzione statisticamente significativa, visibile solo alla quarantottesima ora di rilevazione, nel gruppo esposto a SMG per 7 giorni rispetto al controllo statico ($p < 0.0001$). Per quanto riguarda il gruppo sperimentale delle cellule HEK293 esposte a 24 ore di microgravità simulata non è apprezzabile una differenza statisticamente significativa con il controllo statico.

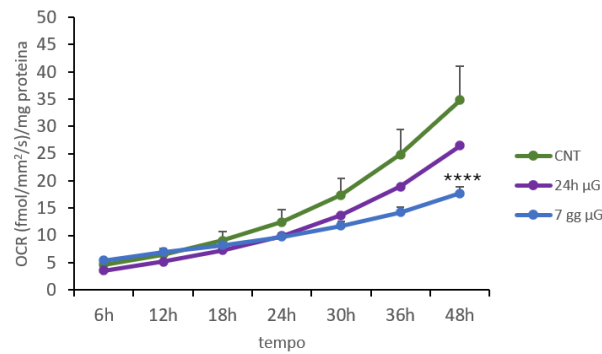
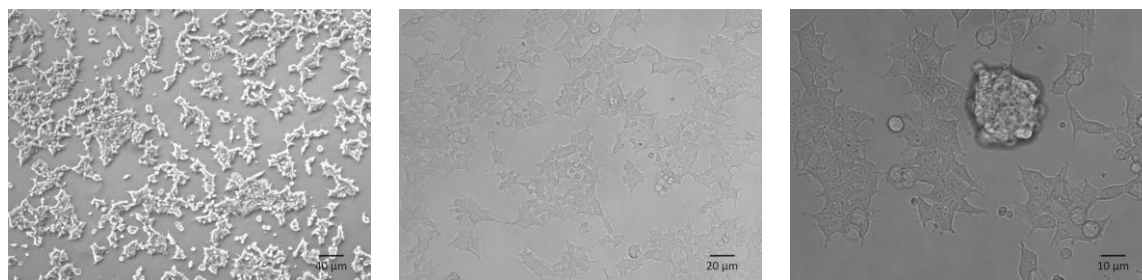


Figura 8: Analisi del consumo di ossigeno (OCR) su cellule singole derivanti da sferoidi di HEK293. Si osserva una diminuzione statisticamente significativa del consumo di ossigeno nel gruppo 7 giorni SMG rispetto al controllo; cellule cresciute a 1g. I dati sono presentati come Media $\pm$ SEM. I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo di Two-Way ANOVA: **** $p < 0.0001$ HEK293 7 giorni vs 1G, $n=3$.

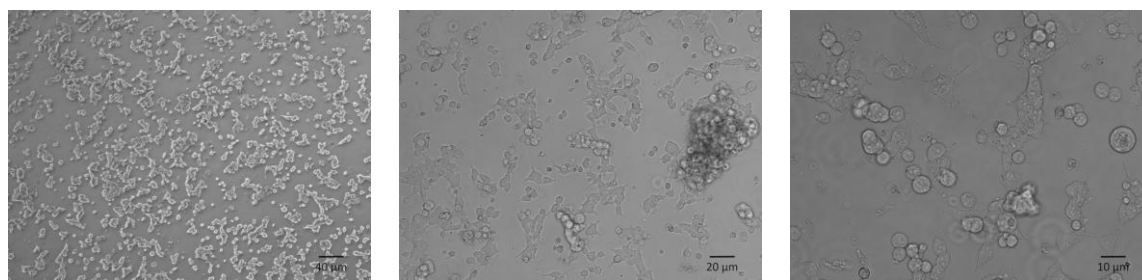
Parallelamente all'analisi del consumo di ossigeno le cellule esposte a microgravità simulata sono state dissociate, piastrate e monitorate 48h, in condizioni 2D statiche per una successiva analisi morfologica. Questa analisi preliminare è necessaria per determinare se le precedenti modifiche viste date dalla microgravità simulata si mantengano o meno da un punto di vista morfologico.

Ciò che si può vedere dalle immagini riportate in Figura 9 A e B sono, rispettivamente, cellule HEK293 precedentemente esposte a SMG per 24 ore (A) e cellule HEK293 precedentemente esposte a SMG per 7 giorni (B). In Figura 9 A le cellule cresciute in adesione mostrano un fenotipo molto simile alle cellule di controllo mai esposte alla microgravità (visibili in Figura 3 A), l'unica caratteristica visibile è la presenza di sferoidi di piccole dimensioni all'interno della coltura. Per quanto riguarda le cellule riportate in Figura 9 B, ossia cellule esposte a microgravità simulata per 7 giorni, dissociate e piastrate a gravità terrestre per 48 ore, quello che si può osservare è una morfologia completamente differente rispetto sia al controllo statico (mai esposto alla microgravità simulata) sia alle cellule HEK293 esposte per 24 ore a microgravità simulata. Si notano cellule che non presentano una morfologia completamente adesa al substrato del supporto in plastica per la coltura, molte cellule appaiono staccate, singole, ma vitali. All'interno del mezzo di coltura sono presenti

e visibili piccoli sferoidi e aggregati cellulari, molto diversi rispetto a quelli presenti e visibili nelle cellule esposte a microgravità per sole 24 ore.



(A)



(B)

Figura 9: Immagini rappresentative di cellule HEK293 precedentemente esposte a microgravità simulata per 24 ore (A) e 7 giorni (B), dissociate e poi piastrate per 48 ore a gravità terrestre.

4.6 Analisi Morfologia degli Sferoidi mediante Sezioni Istologiche

Per valutare la morfologia degli sferoidi ottenuti in condizioni di microgravità simulata, sono state analizzate sezioni istologiche colorate con Blu di Toluidina e osservate mediante microscopia ottica (Figura 9).

Dopo 24 ore di trattamento in RPM, gli sferoidi presentano una morfologia complessivamente compatta, con una distribuzione relativamente omogenea delle cellule e margini ben definiti, in un'architettura marcatamente lassa, simile a un network o a una struttura "a spugna". L'ingrandimento minore (20x) permette di valutare la macro-struttura dell'aggregato. Lo sferoide presenta una forma complessivamente ellissoidale/ovoidale con un diametro maggiore di circa 200–250 μm . La distribuzione delle lacune è omogenea su tutta la sezione, suggerendo che l'effetto della microgravità sia uniforme e non limitato al core o alla periferia della struttura. Ad ingrandimento maggiore non si notano evidenti segni di necrosi massiva centrale (tipica degli sferoidi eccessivamente densi o di grandi dimensioni), il che suggerisce che la struttura aperta e "porosa" indotta dalla microgravità faciliti la diffusione dei nutrienti e lo scambio di gas anche dopo 24 ore di coltura.

Dopo 7 giorni, gli sferoidi appaiono caratterizzati da una minore compattezza strutturale nel core, con una disposizione cellulare apparentemente meno organizzata rispetto ai campioni analizzati a 24 ore. Infatti, si può osservare una netta polarizzazione e compartimentalizzazione della struttura. L'aggregato ha perso la consistenza spugnosa uniforme e si è diviso chiaramente in due componenti distinte:

- 1) un guscio/corteccia periferica (cortex), costituita da una rete esterna estremamente lassa, formata da sottili trabecole cellulari altamente fenestrate che delineano ampi spazi vuoti (questa corona esterna funge quasi da impalcatura di contenimento);
- 2) un core/regione centrale frammentata, costituita dalla porzione interna che mostra una massiva perdita di coesione intercellulare, con un accumulo di cellule singole o piccoli cluster disorganizzati che appaiono fluttuanti o debolmente ancorati al centro della cavità (in alcune sezioni si osservano, inoltre, aree caratterizzate da una ridotta densità cellulare).

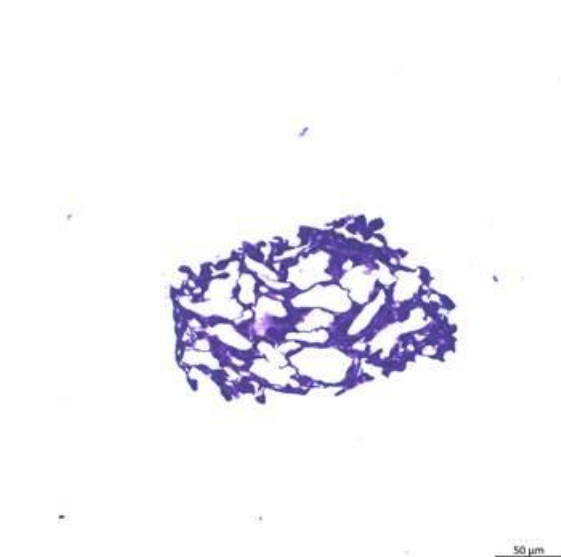
Inoltre, a 24 ore le cellule sono prevalentemente allungate e distese lungo i ponti

cellulari, con giunzioni intercellulari preservate seppur confinate alle estremità dei prolungamenti. Non si registrano cluster di dissociazione massiva.

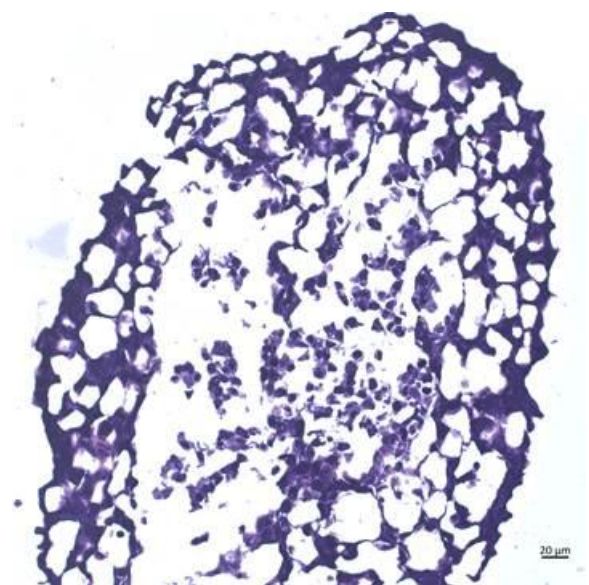
A 7 giorni la perdita di adesione cellulare, nella zona centro-laterale e interna (visibile chiaramente nel dettaglio a 40x), è in una percentuale cospicua di cellule che hanno assunto una morfologia spiccatamente sferica (arrotondata). Questo switch morfologico da allungato/disteso a rotondeggiante isolato è il marker istologico classico della perdita delle giunzioni di ancoraggio (come le caderine) e della transizione verso uno stato di sospensione o de-adesione.

È visibile, inoltre, una certa eterogeneità nucleare e citoplasmatica. Molti dei corpi cellulari isolati mostrano un citoplasma denso e nuclei intensamente basofili. La presenza di piccoli detriti e di cellule isolate suggerisce l'attivazione di pathway di morte cellulare programmata indotta da privazione di ancoraggio (anoikis) o stress metabolico a lungo termine.

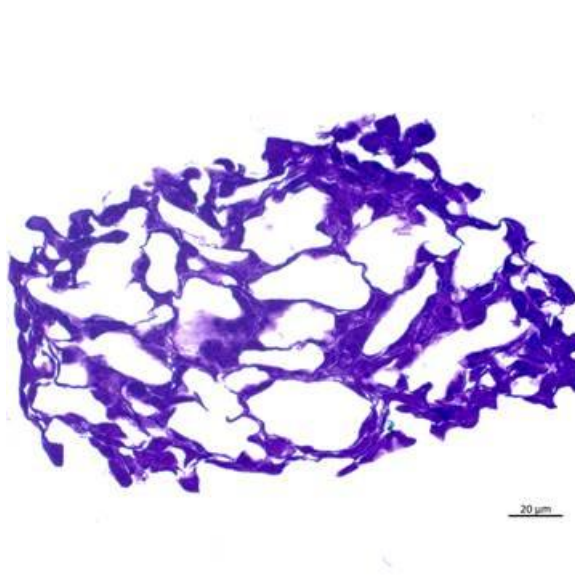
In conclusione, mentre nelle prime 24 ore la microgravità induce un adattamento citoscheletrico che genera uno sferoide "aperto" ma vitale e strutturato, l'esposizione cronica a 7 giorni destabilizza permanentemente l'omeostasi adesiva delle HEK293. La forza di tensione intercellulare non è più sufficiente a mantenere l'integrità del core dello sferoide, esitando in una parziale dissoluzione della massa interna e nel confinamento della struttura organizzata alla sola periferia dell'aggregato.



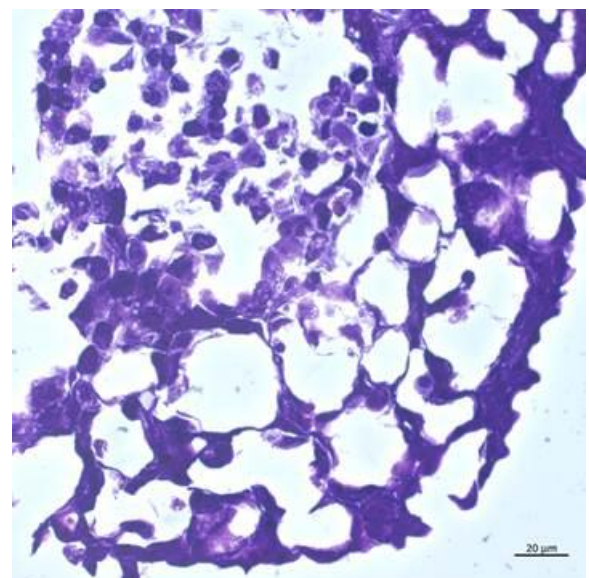
(A) HEK μ G 24h obiettivo 20x



(B) HEK μ G 7 giorni obiettivo 20x



(C) HEK μ G 24h obiettivo 40x



(D) HEK μ G 7 giorni obiettivo 40x

Figura 10: Sezione istologica di sferoidi di cellule HEK293 esposte a μ G e colorate con Blu di Toluidina. (A) Sferoide dopo 24 h osservato con obiettivo 20x; (B) sferoide dopo 7 giorni osservato con obiettivo 20x; (C) sferoide dopo 24 h con obiettivo 40x; (D) sferoide dopo 7 giorni con obiettivo 40x.

5. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

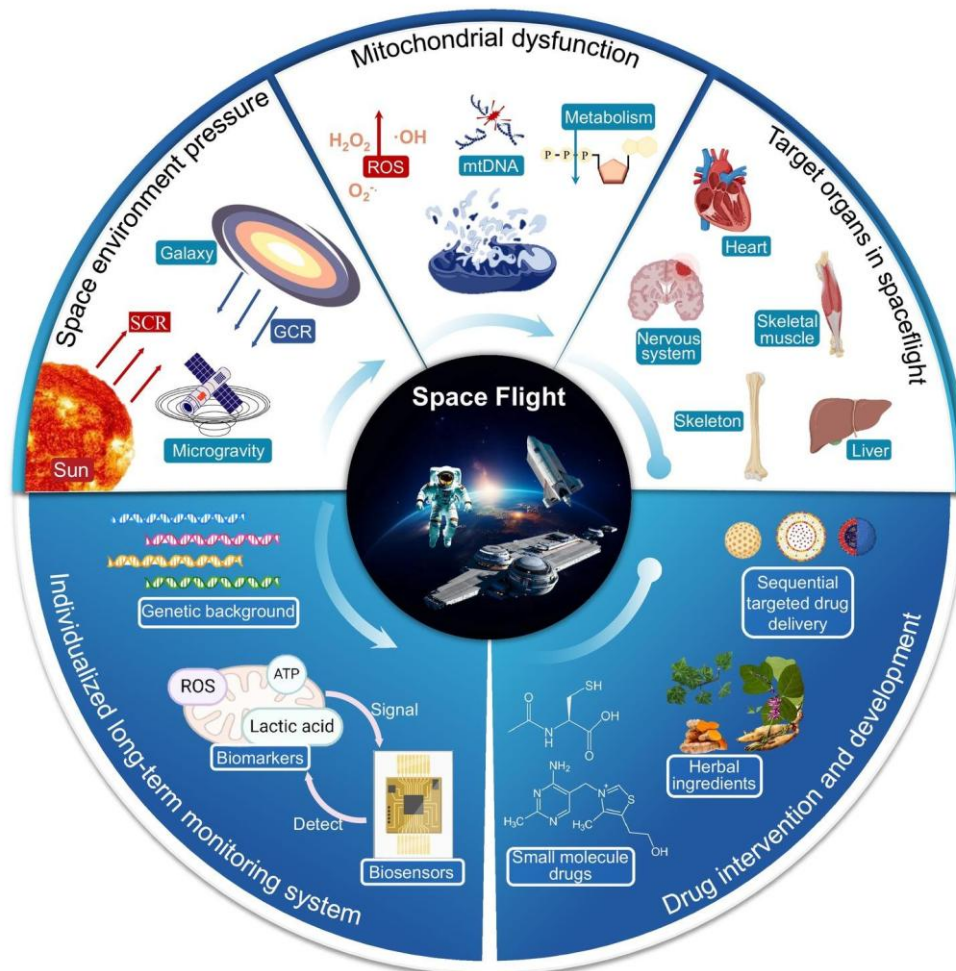


Figura 11: Rappresentazione grafica delle modifiche indotte dalla microgravità, con particolare attenzione al ruolo del mitocondrio. Immagine da Xiao et al. 2025.

La microgravità è identificabile come una condizione caratterizzata da forze gravitazionali minime o quasi impercettibili. Questa condizione può essere sperimentata dall'essere umano o dai modelli cellulari utilizzabili per la ricerca di base nello spazio, ad esempio all'interno della Stazione Spaziale Internazionale, oppure all'interno di strutture specializzate progettate per la simulazione della microgravità. (Ferranti et al. 2020; Wuest et al. 2015).

In biologia la microgravità e, nel contesto di questa tesi, la microgravità simulata, offrono un'opportunità unica per studiare la risposta delle cellule ad una drastica riduzione del vettore gravitazionale, un fattore che regola e ha regolato numerosi

processi naturali sul pianeta Terra (Thiel et al. 2021; López Garzón et al. 2025).

Nonostante sia ampiamente documentato che l'esposizione prolungata alla microgravità, sia reale che simulata, determini gravi alterazioni sistemiche negli astronauti, tra cui possiamo ricordare atrofia muscolare, demineralizzazione ossea, disregolazione immunitaria, il legame meccanicistico a livello cellulare rimane ancora parzialmente indefinito. Molte delle patologie osservate negli astronauti e dunque associate con il volo spaziale condividono un background comune: un forte stress ossidativo (Chen et al. 2025). Tuttavia, non è ancora noto quali siano i precisi pathway molecolari attraverso i quali la microgravità induca il danno ossidativo e alteri il metabolismo energetico a livello cellulare e più specificamente a livello mitocondriale (Nguyen et al. 2021).

Un recente studio di Michaletti e collaboratori del 2017, eseguito su osteoblasti umani primari, offre, attraverso una estensiva analisi di metabolomica e proteomica, una visione di come l'esposizione a microgravità simulata possa portare alla riprogrammazione del metabolismo energetico della cellula e di come questa induca una forte compromissione dell'omeostasi mitocondriale.

In sintesi, la decifrazione delle alterazioni mitocondriali e metaboliche indotte dalla microgravità e/o microgravità simulata rappresentano un requisito fondamentale non solo per preservare la salute degli astronauti e gestire con successo le future missioni spaziali a lungo termine, ma si identifica come possibile mezzo per l'avanzamento in studi di medicina traslazionale sulla Terra. Le disfunzioni bioenergetiche, l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le modifiche del metabolismo cellulare rilevate in condizioni di microgravità riflettono alcuni fenotipi patologici di numerose malattie mitocondriali quali la sarcopenia, il declino cardiovascolare e diverse condizioni neurodegenerative. In questo contesto, la microgravità, sia essa reale o simulata, si configura come una piattaforma ideale per comprendere ed accelerare la comprensione di network patologici complessi e validare contromisure farmacologiche (Neikirk et al. 2024).

In questo panorama si inserisce il lavoro di ricerca riportato in questo elaborato.

Lo studio si è focalizzato sull'analisi degli effetti della microgravità simulata su di una linea cellulare, HEK293 (Human Embryonic Kidney), per identificare possibili

modifiche morfologiche, trascrizionali e funzionali. La linea cellulare HEK293 rappresenta una delle piattaforme *in vitro* più utilizzate e versatili nell'ambito della ricerca biomedica. Nel contesto di questo studio sono state scelte per il loro elevato tasso di crescita ed elevata riproducibilità sperimentale (Tan et al. 2021, Abaandou et al. 2021). La linea cellulare oggetto di studio è stata esposta a microgravità simulata mediante l'utilizzo di un Random Positioning Machine (RPM) per due distinte tempistiche, 24 ore e 7 giorni. La selezione di questi due intervalli temporali è stata definita per delineare un quadro di alterazioni metaboliche globali, distinguendo tra risposte precoci e acute (valutate alla tempistica di 24 ore) e risposte tardive (riscontrabili dopo un'esposizione prolungata per 7 giorni).

Come prima analisi si è proceduto con l'osservazione morfologica delle cellule esposte a microgravità simulata rispetto al controllo cresciuto a gravità terrestre ed in adesione. A seguito di 24 ore di esposizione a microgravità simulata, sono emerse le prime alterazioni fenotipiche, contraddistinte da un parziale distacco dal substrato e dall'accennata formazione di micro-aggregati o sferoidi. Osservazione in linea con quanto riportato nella letteratura corrente (van den Nieuwenhof et al. 2024). Il prolungamento dell'esposizione a 7 giorni totali di microgravità simulata ha indotto una netta trasformazione morfologica, culminata nella formazione di aggregati cellulari tridimensionali e nella concomitante diminuzione della popolazione cellulare ancorata al fondo del supporto di crescita.

Per approfondire ulteriormente l'analisi morfologica è stata eseguita una colorazione con Blu di Toluidina sulle sezioni istologiche degli sferoidi, che ha evidenziato l'evoluzione strutturale degli stessi a seguito dell'esposizione a microgravità simulata per due differenti tempistiche. A 24 ore, gli aggregati presentano una forma ovoidale con all'interno un'architettura omogenea e definibile come "a spugna", questa porosità rilevata potrebbe prevenire la necrosi centrale facilitando la diffusione di gas e nutrienti. Al contrario, l'esposizione a 7 giorni di microgravità simulata determina una netta compartimentalizzazione dello sferoide; si nota una corteccia periferica lassa che racchiude un core centrale frammentato, popolato da cellule isolate e detriti.

L'intensa basofilia nucleare suggerisce l'attivazione a lungo termine di pathway di morte cellulare indotti da stress metabolico e assenza di ancoraggio.

Successivamente all'analisi morfologica si è proceduto con l'analisi del profilo trascrizionale della linea cellulare HEK293 esposta alle due differenti tempistiche a microgravità simulata. Da questa analisi emerge una risposta adattativa dinamica. Nelle prime 24 ore di esposizione si nota una up-regolazione dei geni *GLUT-1*, *HK1*, *LDHA* e *LDHB*, questo suggerisce una riprogrammazione metabolica, nello specifico si potrebbe parlare di glicolisi aerobia o effetto Warburg (Franczak et al., 2023; Qiao et al., 2024; Zhang et al., 2025). Sebbene questa preliminare up-regolazione, dopo l'esposizione di 7 giorni, i livelli di espressione genica per *LDHA* e *LDHB* tornano ad essere uguali a quelli presenti nel controllo statico; per quanto riguarda l'espressione genica di per *GLUT1* e *HK1* vi è una diminuzione tra le 24 ore e i 7 giorni ma rimane sempre una up-regolazione rispetto al controllo statico.

Parallelamente si è analizzata l'espressione dei geni per *SOD1*, *SOD2*, *PGC1-α* e *MITF*. La up-regolazione di *SOD2*, fondamentale enzima antiossidante localizzato a livello della matrice mitocondriale, successivamente all'esposizione a 24 ore di microgravità simulata potrebbe indicare un possibile aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguente danno strutturale e funzionale a livello del mitocondrio (Papa et al. 2014), è però importante osservare come questa momentanea up-regolazione torni ai livelli di espressione genica uguale al controllo statico nel gruppo sperimentale esposto a 7 giorni di microgravità simulata. I livelli di espressione genica di *SOD1*, invece, non subiscono nessuna alterazione rispetto al controllo statico. Questa diversa regolazione genica tra *SOD1* e *SOD2*, con una up-regolazione transitoria del gene che codifica per *SOD2*, potrebbe indicare l'attivazione di una risposta adattativa all'ambiente di microgravità simulata focalizzata a livello mitocondriale. Poiché la *SOD2* è localizzata selettivamente nella matrice mitocondriale mentre la *SOD1* è l'isoforma citoplasmatica predominante e costitutivamente abbondante, questo pattern suggerisce che il trattamento generi uno stress ossidativo circoscritto all'interno del mitocondrio (Wang et al. 2018, Lisse et al. 2020).

PGC1- α è un membro di una famiglia di coattivatori trascrizionali, il quale svolge un ruolo fondamentale e centrale nella regolazione del metabolismo energetico cellulare (Liang & Ward, 2006). Può essere definito come master regolatore dell'espressione genica, coinvolto principalmente nella funzione mitocondriale e nel metabolismo cellulare; con un ruolo legato alla biogenesi mitocondriale e alla difesa dallo stress ossidativo. Presenta un'attività molto interessante, soprattutto nel contesto di questo elaborato di ricerca; collega i segnali ambientali ad una risposta dell'espressione genica. La sua modulazione è finemente regolata da una complessa interazione di segnali ambientali, stato energetico della cellula e specifiche vie di segnalazione come cAMP-CREB, p38 MAPK, AMPK e SIRT1 (Kumar et al. 2025).

Nel modello sperimentale analizzato, l'espressione del gene *PGC1- α* mostra un andamento bifasico: una down-regolazione iniziale a 24 ore di esposizione a microgravità simulata, seguita da un significativo incremento trascrizionale a 7 giorni di esposizione rispetto al controllo statico. In letteratura è ampiamente documentato come, a livello dei neuroni ippocampali sottoposti a privazione di ossigeno e glucosio e nelle cellule muscolari lisce vascolari trattate con estratto di *Ecklonia cava*, l'up-regolazione di *PGC1- α* promuove efficacemente l'espressione di *SOD2* per mitigare i possibili danni indotti da specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Han et al. 2022, Byun et al. 2022). Il disaccoppiamento, come visibile nei dati riportati in questa tesi, di *PGC1- α* dal suo bersaglio a valle *SOD2*, caratterizzato in questo caso da un aumento transitorio seguito da un declino di espressione, suggerisce un coinvolgimento di circuiti regolatori complessi, piuttosto che un'attivazione lineare. Evidenze scientifiche, come riportato da Zhou e colleghi (2025), suggeriscono che una up-regolazione non fisiologica possa innescare conseguenze tali da prevalere sulle tipiche funzioni protettive. L'up-regolazione costante potrebbe innescare dei feedback compensativi che sopprimono proteine chiave come SIRT3 e FNDC5, stimolando al contempo uno stress ossidativo sistemico e risposte infiammatorie guidate da NF- κ B e TNF- α . Questo stato determina quindi una down-regolazione di *SOD2*.

Sulla base delle analisi preliminari relative all'espressione genica in cellule HEK293 esposte a microgravità simulata, si è deciso di proseguire l'indagine focalizzandosi sulla funzionalità mitocondriale. Basandosi sulla up-regolazione del gene per *PGC1- α* , vista a 7 giorni di esposizione di microgravità simulata, si è analizzata la percentuale di cellule positive a MitoTracker. La sonda MitoTracker è selettiva per i mitocondri e si lega in modo covalente alle proteine mitocondriali andando a reagire con i residui di cisteina accumulandosi nella matrice mitocondriale. Questa reazione è indipendente dal potenziale di membrana del mitocondrio e viene quindi utilizzata per andare ad investigare la massa mitocondriale all'interno della cellula (rappresentata come media geometrica dell'intensità) (Presley et al. 2003, Xiao et al. 2016). I dati mostrano che l'esposizione alle due tempistiche di microgravità simulata non modificano la MFI (Media geometrica dell'Intensità logaritmica della Fluorescenza) tra i diversi gruppi sperimentali, indicando l'assenza di modifiche alla massa mitocondriale. Tuttavia, il parametro a subire una variazione è la percentuale di cellule positive alla sonda MitoTracker, che mostra un incremento significativo già a 24 ore di esposizione (Monteiro et al. 2020). Per proseguire e arricchire l'analisi legata alla funzionalità mitocondriale delle cellule esposte a SMG si è proceduto con l'analisi del contenuto relativo di ATP. Come ampiamente documentato in letteratura, la diminuzione nella produzione di ATP rappresenta un meccanismo fondamentale nella disfunzione mitocondriale; questo fenomeno può essere legato a danni ossidativi che compromettono l'efficienza dei complessi enzimatici della catena del trasporto degli elettroni e della fosforilazione ossidativa (Bhatti et al. 2017). Dunque, ciò che osserviamo nei dati raccolti in questa tesi suggerisce un probabile compromissione del mitocondrio, dato che già da una breve esposizione a microgravità simulata (24 ore) si osserva una diminuzione significativa di contenuto relativo di ATP. Andamento visibile anche nei 7 giorni di esposizione rispetto al controllo statico.

Infine, sono state eseguite analisi relative al consumo di ossigeno. Il set-up sperimentale ha analizzato le 48 ore successive all'esposizione ai due diversi intervalli di microgravità simulata. I risultati mostrano un calo del consumo di ossigeno solo alla 48esima ora nel gruppo sottoposto a 7 giorni di microgravità

simulata rispetto al controllo, mentre non sono apprezzabili differenze per il gruppo esposto solo a 24 ore. Tale modulazione, è coerente con la riduzione di ATP precedentemente descritta, suggerendo l'insorgenza di una disfunzione mitocondriale (Bhatti et al. 2017, Shimura et al. 2019).

In conclusione, ciò che emerge da questa analisi preliminare riportata nell'elaborato di tesi relativa all'esposizione a microgravità simulata di una linea cellulare (HEK293), è un quadro complesso di regolazione in cui i cambiamenti morfologici, trascrizionali e bioenergetici si intrecciano in una risposta adattativa tempo-dipendente.

Il modello in vitro HEK293 esposto a Random Positioning Machine si è dimostrato una piattaforma robusta e sensibile per studiare la cascata di eventi che collega la trasduzione cellulare alla disfunzione mitocondriale. Sebbene siano necessarie ulteriori indagini (come la quantificazione diretta dei ROS mitocondriali, l'analisi proteomica dei complessi della catena respiratoria e la valutazione dei marker di apoptosi) i risultati di questa tesi aggiungono un tassello fondamentale alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base del danno da volo spaziale.

Oltre alle evidenti ricadute nel campo della biomedicina spaziale per la tutela della salute degli astronauti in vista delle future missioni a lungo termine, la delucidazione di questi network patologici offre promettenti prospettive traslazionali sulla Terra. Comprendere come la microgravità acceleri il declino energetico e la senescenza cellulare rappresenta, infatti, un valido strumento per identificare nuovi bersagli terapeutici e validare contromisure farmacologiche applicabili a patologie mitocondriali, cardiovascolari e neurodegenerative diffuse nella popolazione anziana globale.

6. BIBLIOGRAFIA

Abaandou, L., Quan, D., & Shiloach, J. (2021). Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells*, 10(7), 1667. <https://doi.org/10.3390/cells10071667>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Libro “*Biologia molecolare della cellula*” (6^a ed.). Zanichelli. ISBN 978-8808621269

Anwar, S., Sarwar, T., Khan, A. A., & Rahmani, A. H. (2025). Therapeutic Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase (SOD) in Different Pathogenesis. *Biomolecules*, 15(8), 1130. <https://doi.org/10.3390/biom15081130>

Ayyaswamy, P.S., & Mukundakrishnan, K. (2007). Optimal conditions for simulating microgravity employing NASA designed rotating wall vessels. *Acta Astronautica*, 60(4–7), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2006.09.008>

Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(5), 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>

Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. *Biochemical Journal*, 435(2), 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>

Brooks, G.A. (2018). The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metabolism*, 27(4), 757–785. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>

Byun, K. A., Oh, S., Yang, J. Y., Lee, S. Y., Son, K. H., & Byun, K. (2022). Ecklonia cava extracts decrease hypertension-related vascular calcification by

modulating PGC-1 α and SOD2. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 153, 113283. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113283>

Chang, W., Worman, H. J., & Gundersen, G. G. (2015). Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol.* 2015;208(1):11-22. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409047>

Chen, Z., Xie, J., Ma, C., Zhang, P., & Lei, X. (2025). Oxidative Damage Under Microgravity Conditions: Response Mechanisms, Monitoring Methods and Countermeasures on Somatic and Germ Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4583. <https://doi.org/10.3390/ijms26104583>

El Khoury, A., & Papanephytous, C. (2025). Flipping the Target: Evaluating Natural LDHA Inhibitors for Selective LDHB Modulation. *Molecules*, 30(14), 2923. <https://doi.org/10.3390/molecules30142923>

Ferranti, F., Del Bianco, M., & Pacelli, C. (2020). Advantages and limitations of current microgravity platforms for space biology research. *Applied Sciences*, 11(1), 68. <https://doi.org/10.3390/app11010068>

Forghani, P., Rashid, A., Armand, L. C., Wolfson, D., Liu, R., Cho, H. C., Maxwell, J. T., Jo, H., Salaita, K., & Xu, C. (2024). *Simulated microgravity improves maturation of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Scientific Reports*, 14, 2243. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52453-1>

Franczak, M. A., Krol, O., Harasim, G., Jedrzejewska, A., Zaffaroni, N., Granchi, C., Minutolo, F., Avan, A., Giovannetti, E., Smolenski, R. T., & Peters, G. J. (2023). Metabolic Effects of New Glucose Transporter (GLUT-1) and Lactate Dehydrogenase-A (LDH-A) Inhibitors against Chemoresistant Malignant Mesothelioma. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 7771. <https://doi.org/10.3390/ijms24097771>

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1), 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>

Grimm, D., Wehland, M., Corydon, T.J., et al. (2020). The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 9(8), 882–894. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0084>

Han, B., Zhao, H., Gong, X., Sun, J., Chi, S., Liu, T., & Xie, A. (2022). Upregulation of PGC-1 α Attenuates Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Hippocampal Neuronal Injury. *Neural plasticity*, 2022, 9682999. <https://doi.org/10.1155/2022/9682999>

Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., et al. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell*, 23(3), 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.003>

Hasenstein, K.H., & van Loon, J.J.W.A. (2015). Clinostats and other rotating systems—design, function, and limitations. In: *Generation and Applications of Extra-Terrestrial Environments on Earth* (pp. 147–156). River Publishers. ISBN: 978-8793237537

Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P. C., de Geest, M., Hauslage, J., Hilbig, R., Hill, R. J., Lebert, M., Medina, F. J., Vagt, N., Ullrich, O., van Loon, J. J., & Hemmersbach, R. (2013). Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1089/ast.2012.0876>

Ingber, D.E. (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 7), 1157–1173. <https://doi.org/10.1242/jcs.00359>

Kim, S.M., Kim, H., Yang, D., Park, J., Park, R., Namkoong, S., et al. (2016). An experimental and theoretical approach to optimize a three-dimensional clinostat for life science experiments. *Microgravity Science and Technology*, 29(1–2), 97–106. <https://doi.org/10.1007/s12217-016-9529-2>

Kim, T.Y. (2020). Theoretical study on microgravity and hypogravity simulated by random positioning machine. *Acta Astronautica*, 177, 684–696. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2020.07.047>

Kumar, A. P., & Puthussery, D. T. (2025). Regulation of PPAR- γ coactivator-1 α and its implication in mitochondrial function and neurodegenerative diseases. *Ageing research reviews*, 112, 102887. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2025.102887>

Liang, H., & Ward, W. F. (2006). *PGC-1 α : A key regulator of energy metabolism*. *Advances in Physiology Education*, 30(4), 145-151. <https://doi.org/10.1152/advan.00052.2006>

Lisse, T. S. (2020). Vitamin D Regulation of a SOD1-to-SOD2 Antioxidative Switch to Prevent Bone Cancer. *Applied Sciences*, 10(7), 2554. <https://doi.org/10.3390/app10072554>

López Garzón, N. A., Pinzón-Fernández, M. V., Saavedra T, J. S., Nati-Castillo, H. A., Arias-Intriago, M., Salazar-Santoliva, C., & Izquierdo-Condoy, J. S. (2025). Microgravity and Cellular Biology: Insights into Cellular Responses and Implications for Human Health. *International journal of molecular sciences*, 26(7), 3058. <https://doi.org/10.3390/ijms26073058>

Mao, W., Huai, Y., An, L., Wang, X., Ru, K., Patil, S., Zhang, W., Ran, F., Chen, Z., & Qian, A. (2024). *Microgravity inhibits cell proliferation and promotes senescence and apoptosis in embryonic stem cells*. *Space Science & Technology*, 4, 0104. <https://doi.org/10.34133/space.0104>

Masini, M. A., Bonetto, V., Manfredi, M., Pastò, A., Barberis, E., Timo, S., Vanella, V. V., Robotti, E., Masetto, F., Andreoli, F., Fiore, A., Tavella, S., Sica, A., Donadelli, M., & Marengo, E. (2022). *Prolonged exposure to simulated microgravity promotes stemness impairing morphological, metabolic and migratory profile of pancreatic cancer cells: A comprehensive proteomic, lipidomic and transcriptomic analysis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), Article 226. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04243-z>

Michaletti, A., Gioia, M., Tarantino, U., & Zolla, L. (2017). Effects of microgravity on osteoblast mitochondria: a proteomic and metabolomics profile. *Scientific reports*, 7(1), 15376. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15612-1>

Monti, N., Masiello, M. G., Proietti, S., Catizone, A., Ricci, G., Harrath, A. H., Alwasel, S.H., Cucina, A., & Bizzarri, M. (2021). Survival pathways are differently affected by microgravity in normal and cancerous breast cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 862. <https://doi.org/10.3390/ijms22020862>

Monteiro, L. B., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F., & Moraes-Vieira, P. M. M. (2020). Using flow cytometry for mitochondrial assays. *MethodsX*, 7, 100938. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100938>

Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

Narayanan, A. (2023). Gravity's effect on biology. *Frontiers in Physiology*, 14,

1199175. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1199175>

Neikirk, K., Stephens, D. C., Beasley, H. K., Marshall, A. G., Gaddy, J. A., Damo, S. M., & Hinton, A., Jr (2024). Is space the final frontier for mitochondrial study?. *BioTechniques*, 76(2), 46–51. <https://doi.org/10.2144/btn-2023-0071>

Nguyen, H. P., Tran, P. H., Kim, K. S., & Yang, S. G. (2021). The effects of real and simulated microgravity on cellular mitochondrial function. *NPJ microgravity*, 7(1), 44. <https://doi.org/10.1038/s41526-021-00171-7>

Papa, L., Hahn, M., Marsh, E. L., Evans, B. S., & Germain, D. (2014). SOD2 to SOD1 switch in breast cancer. *The Journal of biological chemistry*, 289(9), 5412–5416. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.526475>

Pesce, N. A., Seminara, G., Giarrusso, G., & Tomasello, M. F. (2025). *HK1 and HK2 beyond glycolysis: Mitochondrial interactions and dual roles in metabolism and cell fate. Advanced Biology*, 9, e2500472. <https://doi.org/10.1002/adbi.202500472>

Presley, A. D., Fuller, K. M., & Arriaga, E. A. (2003). MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 793(1), 141–150. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00371-4](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00371-4)

Puigserver, P., & Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24(1), 78–90. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0012>

Qiao, Q., Hu, S., & Wang, X. (2024). The regulatory roles and clinical significance of glycolysis in tumor. *Cancer communications (London, England)*, 44(7), 761–

786. <https://doi.org/10.1002/cac2.12549>

Shibata, S., Sogabe, S., Miwa, M., Fujimoto, T., Takakura, N., Naotsuka, A., Kitamura, S., Kawamoto, T., & Soga, T. (2021). *Identification of the first highly selective inhibitor of human lactate dehydrogenase B*. *Scientific Reports*, 11, 21353. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00820-7>

Shimura, M., Nozawa, N., Ogawa-Tominaga, M., Fushimi, T., Tajika, M., Ichimoto, K., Matsunaga, A., Tsuruoka, T., Kishita, Y., Ishii, T., Takahashi, K., Tanaka, T., Nakajima, M., Okazaki, Y., Ohtake, A., & Murayama, K. (2019). Effects of 5-aminolevulinic acid and sodium ferrous citrate on fibroblasts from individuals with mitochondrial diseases. *Scientific reports*, 9(1), 10549. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46772-x>

Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., & Arbel, N. (2010). *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death*. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(3), 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>

Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>

Thiel, C. S., Vahlensieck, C., Bradley, T., Tauber, S., Lehmann, M., & Ullrich, O. (2021). Metabolic Dynamics in Short- and Long-Term Microgravity in Human Primary Macrophages. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6752. <https://doi.org/10.3390/ijms22136752>

Uzer G, Thompson WR, Sen B, et al. Cell Mechanosensitivity to Extremely Low-Magnitude Signals Is Enabled by a LINCed Nucleus. *Stem Cells*. 2015;33(6):2063-

2076. <https://doi.org/10.1002/stem.2004>

Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016). The regulation and function of lactate dehydrogenase A: Therapeutic potential in brain tumor. *Brain Pathology*, 26(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/bpa.12299>

van den Nieuwenhof, D. W. A., Moroni, L., Chou, J., & Hinkelbein, J. (2024). Cellular response in three-dimensional spheroids and tissues exposed to real and simulated microgravity: A narrative review. *npj Microgravity*, 10, 102. <https://doi.org/10.1038/s41526-024-00442-z>

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>

Vulturar, R., Chiş, A., Pintilie, S., Farcaş, I. M., Botezatu, A., Login, C. C., Sitar-Taut, A.-V., Orasan, O. H., Stan, A., Lazea, C., Al-Khzouz, C., Mager, M., Vinţan, M. A., Manole, S., & Damian, L. (2022). One Molecule for Mental Nourishment and More: Glucose Transporter Type 1—Biology and Deficiency Syndrome. *Biomedicines*, 10(6), 1249. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061249>

Wallace D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(10), 685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>

Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of cell biology*, 217(6), 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>

Wilson J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of experimental biology*, 206(Pt 12), 2049–2057. <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>

Wuest, S.L., Richard, S., Kopp, S., Grimm, D., & Egli, M. (2015). Simulated microgravity: critical review on the use of RPM for mammalian cell culture. *BioMed Research International*, 2015, 971474. <https://doi.org/10.1155/2015/971474>

Xiao, B., Deng, X., Zhou, W., & Tan, E. K. (2016). Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 76. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00076>

Xiao Z., Zhang P., Zhao Q., et al. (2025). Space health hub: Mitochondrial protection and therapeutic strategies for long-term space missions. *The Innovation Life* 3:100142. <https://doi.org/10.59717/j.xinn-life.2025.100142>

Zhang, H., Liu, S., Fu, S., Zhao, Q., Wang, Y., Yuan, Y., & Zhang, C. (2025). Novel insight into the Warburg effect: Sweet temptation. *Critical reviews in oncology/hematology*, 214, 104844. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104844>

Zhao, J., Ma, H., Wu, L., Cao, L., Yang, Q., Dong, H., Wang, Z., Ma, J., & Li, Z. (2017). The influence of simulated microgravity on proliferation and apoptosis in U251glioma cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 53, 744–751. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0178-6>

Zhao, T., Li, R., Tan, X., Zhang, J., Fan, C., Zhao, Q., Deng, Y., Xu, A., Lukong, K. E., Genth, H., & Xiang, J. (2018). Simulated microgravity reduces focal adhesions and alters cytoskeleton and nuclear positioning leading to enhanced apoptosis via suppressing FAK/RhoA-mediated mTORC1/NF-κB and ERK1/2 pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1994. <https://doi.org/10.3390/ijms19071994>

Zhou, L., Mozaffaritabar, S., Koltai, E., Giannopoulou, S., Kolonics, A., Gu, Y., Pinho, R. A., Miklossy, I., Boldogh, I., & Radák, Z. (2025). Consecutive skeletal muscle PGC-1 α overexpression: A double-edged sword for mitochondrial health in the aging brain. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1871(6), 167851. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2025.167851>