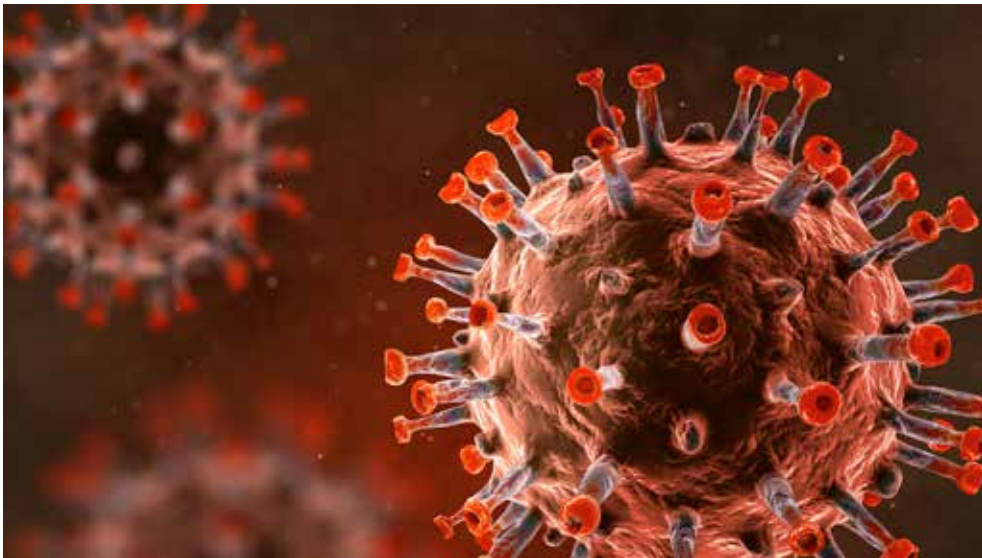


SARS COV-2

IL RUOLO DEI NEUTROFOLI E IL FENOMENO DELLA NETOSI



di **Giulia Sanino**, farmacista

Rispetto alla nuova epidemia da Sars cov-2, ci sono ancora molti tasselli che la scienza sta cercando di scoprire. Grazie al lavoro di studio e ricerca della nostra collega Giulia Sanino, abbiamo già iniziato ad entrare in alcuni meccanismi oggetto di studi e ipotesi molto avvincenti sui meccanismi cellulari che stanno alla base dei danni provocati dal virus. In questo articolo, analizzeremo un aspetto particolare, ovvero il ruolo dei neutrofili che, da alleati del nostro organismo, in questa strana epidemia si pos-

sono trasformare in alleati del virus. Quando i linfociti T rilasciano TNF, IL-17 e IFN gamma, i neutrofili vengono infatti richiamati e rilasciano le loro reti (NET). Recentemente, sono stati eseguiti numerosi studi che hanno confermato la presenza di NET nel siero di pazienti Covid-19 gravi. Vediamo il meccanismo di azione di questo sistema che può trasformarsi da un metodo di difesa a un grave problema. Si può, infatti, pensare che le NET possano in parte innescare quell'immunotrombosi che sappiamo essere causa di moltissime complicazioni.

Quante volte in questi mesi ci siamo sentiti "intrappolati", in una rete di informazioni che sembrava trasformare la famigerata pandemia in una infodemia senza precedenti, paralizzando totalmente il nostro pensiero critico e destabilizzandoci?

Immaginatevi ora al centro di una tempesta, in mare, dove ci sono scialuppe infuocate e scoppi di carburante, fiamme, onde, schiamazzi, richieste d'aiuto. A riva, i vostri amici vi hanno lanciato una rete, ma siccome le persone da salvare erano troppe, ora le reti sono una sull'altra, e vi soffocano anziché portarvi in salvo.

Chi sono i vostri amici? I neutrofili, supereroi tempestivi.

E la tempesta infuocata? La tempesta citochinica, incontrollata, causata da Covid-19.

Quanto alle reti di salvataggio, penso alle Net; mentre il nemico è, chiaramente, il virus Sars Cov-2, in grado di soffocare "moltiplicando" le reti.

Ho utilizzato questa metafora per introdurre un particolare meccanismo di difesa, attivato da "supereroi simil Uomo Ragno", i neutrofili, che prontamente il nemico Sars Cov-2 cerca di eludere o sfruttare a suo vantaggio.

Nei casi più gravi, il virus riesce nel proprio intento e quella schiera di "uomo Ragno", si trasforma in pericolosi kamikaze, sabotando proprio quell'intervento tempestivo messo in atto nelle prime fasi della difesa contro il nemico.

Si sente poco parlare di loro, molto più conosciuti, invece i "cugini" dell'immunità specifica, i linfociti T (Treg, T-helper e citotossici) e i linfociti B, (che producono gli anticorpi e la memoria contro il virus), in realtà i neutrofili sono il 60-70% dei globuli bianchi circolanti, possiedono granuli citoplasmatici con cui fagocitano gli intrusi e li uccidono grazie agli enzimi degradativi.

Spesso sono i primi ad arrivare sul luogo dell'infezione, solo dal 2004, si è scoperto il loro "super potere", che è appunto il meccanismo che prende il nome di Netosi.

I neutrofili, proprio come l'uomo ragno, riescono a produrre delle vere e proprie ragnatele appiccicose, fatte da residui di cromatina, istoni, e proteine tossiche che intrappolano gli agenti patogeni (virus e batteri), limitandone la loro diffusione.

Quando i linfociti T rilasciano TNF, IL-17 e IFN gamma, i neutrofili vengono richiamati e rilasciano le loro reti (NET).

Andrew Weber, pneumologo e specialista di terapia intensiva di New York, insieme a Mikala Egeblad, vedendo la prima ondata di pazienti affetti da Covid-19, con polmoni ostruiti di muco denso e invasi da neutrofili, decise di iniziare uno studio per cercare le NET nei campioni di siero dei pazienti.

Sono stati eseguiti numerosi studi che hanno confermato la presenza di NET, nel siero di pazienti Covid-19 gravi.

In uno studio eseguito il 29 giugno 2020 di Middleton et al. sono state eseguite autopsie polmonari, in pazienti Covid-19, che hanno trovato Net all'interno dei microtrombi presenti nel tessuto polmonare. Da qui si può dedurre che le NET possano in parte innescare l'immunotrombosi.

Nei pazienti più gravi, è proprio la tempesta citochinica che scatena la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), nel 10%-15% dei pazienti Covid-19. Numerose ricerche avevano già collegato l'ARDS alla formazione di NET. I mediatori di questa tempesta regolano l'attività dei neutrofili e aumentano il traffico di questi verso i siti di infiammazione.

In un altro studio di Barnes et al. si descrive come i NET in eccesso possano spiegare gli effetti multiorgano di Covid-19, grazie al loro coinvolgimento diretto nel sistema immunitario, nella fisiopatologia vascolare e nella regolazione della coagulazione. Quando i NET circolano ad alti livelli, possono occludere i piccoli vasi portando danni a polmone, cuore e reni (Laridan 2019).

Gli istoni extracellulari rilasciati dalle reti dei neutrofili possono promuovere l'aggregazione piastrinica, in quanto si possono legare sui recettori delle piastrine. (Semeraro et al)

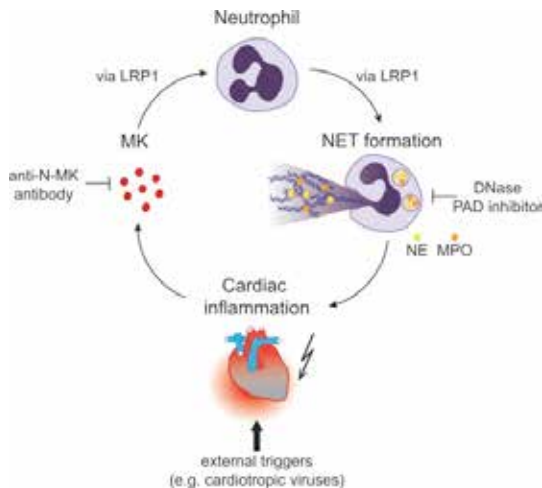
Il virus riuscirebbe dunque a trasformare un'arma a suo sfavore in un suo alleato, perché il richiamo incontrollato di macrofagi e neutrofili e il rilascio di NET sarebbe in grado di danneggiare i tessuti in cui sono rilasciate.

La scoperta di questo nuovo meccanismo, implicato nel danno polmonare ma anche endoteliale

riscontrato in Covid-19, apre la strada allo studio di nuove strategie che abbiano come bersaglio la netosi e le proteine in grado di innescare questo processo.

A questo proposito, introduciamo una proteina che è in grado di richiamare i neutrofili, promuovere la loro adesione all'endotelio, e indurre la netosi in pazienti affetti da miocardite.

Stiamo parlando di Midkine, un fattore di crescita legante l'eparina, che media la formazione di NET nel tessuto cardiaco di pazienti con miocardite. Midkine recluta i neutrofili polimorfonucleati attraverso il suo recettore LRP1, i quali rilasciano le NET che contribuiscono alla patogenesi della malattia.



Midkine è una proteina di 13 kDa, che potrebbe avere un ruolo cruciale in Covid 19, non solo come mediatore di NETOSI, ma anche come proteina in grado di legarsi al virus Sars Cov-2, favorendo il legame con Ace2, e l'internalizzazione all'interno della cellula.

Come ben sappiamo l'ingresso del virus avviene grazie al recettore Ace2, presente sulla membrana citoplasmatica, alcuni ricercatori, pensano che la presenza di Ace2 non sia esaustiva, ma ci sia sulla membrana un altro corecettore che aiuti ad "accumulare" il virus favorendo poi il legame successivo ad Ace2. Midkine strutturalmente possiede due siti di legame per l'eparina, ci sono studi che dimostrano che la Spike protein ha due subunità la S1 e la S2, la subunità S1, possiede un sito con alta affinità per i glicosaminoglicani (eparina ed eparan solfato).

Midkine si lega ad un complesso recettoriale

Glossario

Linfociti T: cellule fondamentali della risposta immunitaria che maturano nel timo.

Linfociti T reg: sottopopolazione di linfociti, che moderano risposte immuni troppo elevate.

Linfociti B: cellule del sistema immunitario, che una volta attivate, liberano anticorpi, esprimendo immunoglobuline sulla superficie.

Risposta immunitaria specifica: realizzata da linfociti T e linfociti B, quando esse riconoscono su sostanze estranee l'antigene.

Risposta immunitaria innata: primo meccanismo di difesa contro aggressori esterni es. il complemento, le citochine, i fagociti, che servono a distruggere i microrganismi.

Neutrofili: cellule fagocitarie, sono il 60-70% dei globuli bianchi circolanti, hanno granuli citoplasmatici e sono prodotti dal midollo osseo, protagonisti della risposta immunitaria aspecifica.

Netosi: meccanismo per cui i neutrofili rilasciano una rete extracellulare formata da DNA ed enzimi con cui devono distruggere microrganismi, virus e batteri.

Net: reti appiccicose, formate da filamenti di cromatina (DNA) ed enzimi litici liberate da neutrofili.

Spike protein: è una glicoproteina presente sulla superficie del Sars Cov-2, quella che definisce la classica forma a "corona", è il bersaglio di vaccini e anticorpi che dovrebbero neutralizzarla.

Subunità S1: parte della spike protein che si lega al recettore della cellula ospite (ACE2).

Subunità S2: parte della spike protein che fa in modo che il virus riesca a fondersi con la membrana cellulare.

SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterone, regola il volume dei fluidi extracellulari, quando si riduce il volume sanguigno, la renina trasforma l'angiotensinogeno in Angiotensina I, l'Ace trasforma l'Angiotensina I in Angiotensina II, Angiotensina II si lega al recettore AT1 provocando vasocostrizione, infiammazione e ritenzione di sodio.

Syndecan-1: è un proteoglicano, ossia una proteina con un cuore legato alla membrana e delle catene laterali che legano i glicosaminoglicani e i fattori di crescita.

Glicosaminoglicani: noti anche come GAGs o mucopolisaccaridi sono lunghe catene "non ramificate" formate da unità disaccaridiche, alcuni esempi: condroitin solfato, eparan solfato, eparina, acido ialuronico, servono a regolare la struttura della matrice extracellulare, e a lubrificare le articolazioni.

formato da più recettori, uno di essi è un proteoglicano, il Syndecan-1, una sorta di "albero", formato da un core proteico, legato alla membrana e da "rami" fluttuanti nella matrice extracellulare formati da lunghe catene di glicosaminoglicani, esso lega eparan solfato e fattori di crescita, tra cui proprio Midkine.

Secondo la mia teoria, il corecettore in grado di "condensare" il virus sulla membrana potrebbe proprio essere lui, vista l'affinità per midkine ed eparan solfato. Esistono infatti studi che rive-

IL FARMACISTA E LE VACCINAZIONI



13
crediti

EVENTO ECM
FAD



I farmacisti durante questa pandemia sono stati sempre presenti, 24 ore su 24, anche oltre il loro orario di lavoro, dimostrando di essere l'unico vero punto di riferimento sanitario sul territorio.

Utifar crede che il farmacista, per questo motivo, sarà coinvolto in ulteriori attività di prevenzione e ha voluto quindi organizzare un corso dal titolo "Il farmacista e le vaccinazioni".

Il corso ha come obiettivo quello di fornire ai farmacisti la formazione necessaria per la somministrazione dei vaccini, in modo da essere pronti in caso di una modifica della normativa.

- **Validità dal 20/08/2020 al 20/08/2021**
- **13 crediti Ecm**
- **Costo: € 50**
- **Iscrizioni sul sito www.utifar.it dal 20/08/2020**

Partner:



Con il patrocinio di



SCEGLI IL MEGLIO. SCEGLI IL LED.



Prodotti
su misura
Strumenti
di alta qualità



Progetto
tutto incluso
Noleggio
& leasing



Grafico
dedicato
Backup
dei contenuti



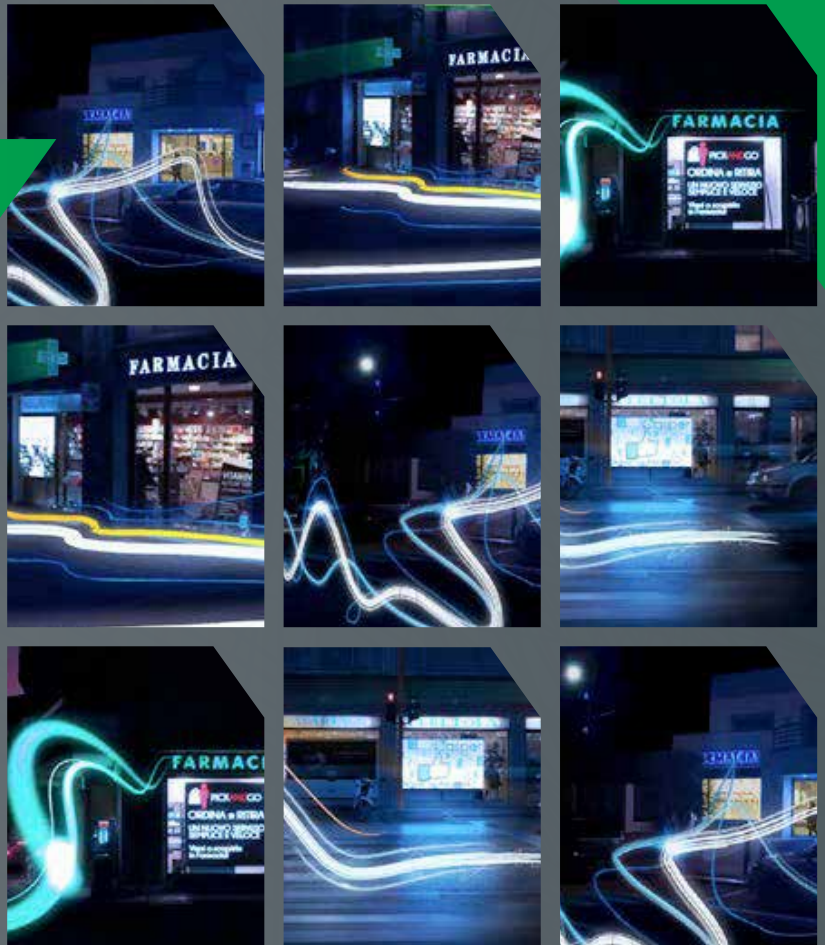
+600 vetrine
installate
Assistenza
h24/24

780
farmacie

39
negozi

25
attività

Schermi per vetrina
visibili in qualsiasi condizione
di luce o distanza,
personalizzabili per allestire
vetrine commerciali,
negozi e spazi espositivi.



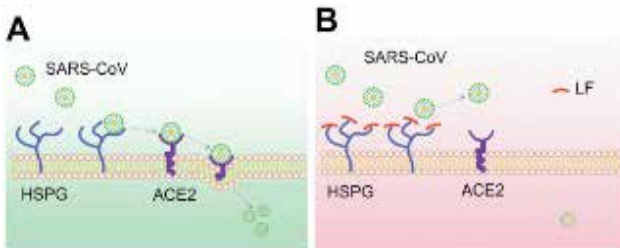
2 Gem

Via Arno 108 - 50019
Sesto Fiorentino (FI)

info@2gem.it - www.2gem.it
Tel. 055.302.4394

lano un'alta concentrazione di eparan solfato in presenza di Sars Cov-2. Ulteriore conferma di ciò è la teoria proposta da alcuni ricercatori, secondo la quale la somministrazione di eparina nelle fasi iniziali dell'infezione, sarebbe in grado di limitare la replicazione virale, questo perché l'eparina somministrata dall'esterno, andrebbe a legarsi al sito di affinità per i glicosaminoglicani sulla subunità S1 del virus, formando come una sorta di tappo che impedisce ad altre molecole, come eparan solfato o midkine, di legarsi in quel sito e favorire l'ingresso del virus.

Una volta legato il virus, Midkine, grazie al suo secondo recettore LRP-1, il quale è un mediatore dell'endocitosi, e si trova sulle zattere lipidiche, riuscirebbe ad inglobare il virus, interiorizzandolo nell'endocita, insieme a syndecan e Ace2, veicolandolo all'interno del nucleo, dove il virus potrebbe iniziare la sua replicazione.



Un ruolo importante è quello di Adam17, un enzima metalloproteasi che scinde Ace2, operando un taglio proteolitico, in parole semplici "decapita" la testa di Ace2, liberando appunto la parte solubile che agisce in due modi: da una parte ha effetti cardioprotettivi e contrasta le azioni dell'angiotensina II, dall'altra è in grado di legarsi alla subunità della spike protein fungendo da tappo per il virus e ostacolando il legame del virus stesso con il recettore Ace2 intero legato alla membrana citoplasmatica. Interessante notare che le dimensioni della "testa decapitata di Ace2, coincidano perfettamente con le dimensioni di midkine, ossia corrispondano a 13 kDa.

Secondo la mia teoria dunque, il virus userebbe Midkine per più di un motivo:

- 1)** Midkine è un modulatore del Sistema renina angiotensina aldosterone, lo stesso che lui prende di mira per entrare nella cellula, nonché per disregolare l'equilibrio che lega il rene al sistema cardiocircolatorio;
- 2)** Midkine attraverso una specifica via di segnalazione (mTOR), inibisce l'autofagia, e il virus

cerca di eludere questo meccanismo "buono" che l'organismo attiva per distruggere gli intrusi;

- 3)** attraverso midkine e il suo recettore riuscirebbe a concentrarsi meglio sulla superficie cellulare, e dunque aumenterebbe la sua affinità per Ace2, grazie al quale entra;

- 4)** entrando nella cellula insieme a Midkine, riuscirebbe a promuovere alcune delle azioni di midkine, tra cui il richiamo dei neutrofilo, i quali, aderendo in modo incontrollato all'endotelio, provocherebbero una Netosi disregolata che danneggerebbe i tessuti circostanti.

Una rete piuttosto ingarbugliata, di meccanismi, citochine, molecole di segnale, che anziché aiutare l'organismo a distruggere il virus, lo aiuterebbe a replicarsi in modo ancora più efficace.

La speranza di riuscire a sgarbugliare quella rete, è quella di farlo trovando delle sostanze capaci di bloccare a monte questo infingardo "tessitore", augurandomi che una possibile strategia, possa essere quella di portare avanti studi clinici su inibitori di Midkine, per verificare se in vitro o in vivo, le stesse azioni ritrovate in letteratura possano essere confermate, e finalmente si possa invertire la rotta, cogliendo in trappola Sars Cov-2.

Bibliografia

- Heparan sulfate proteoglycans at a glance. Kirkpatrick CA, Selleck SB. 2007, *J Cell Sc*, p. 120(Pt 11):1829-3210.1242/jcs.03432.
- Transmembrane signaling proteoglycans. JR., Couchman. 2010, *Annu Rev Cell Dev Bio*, p. 26:89-11410.1146/annurev-cellbio-100109-104126.
- Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. Xian X, Gopal S, Couchman JR. 2010, *Cell Tissue Res* (2010), p. 339(1):31-4610.1007/s00441-009-0829-3.
- Takada, T., Toriyama, K., Muramatsu, H., Song, X.-J., Torii, S., and Muramatsu, T. i. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J. Biochem.* 1997, 122, 453-458.
- Structural characteristics of heparin-like domain required for interaction of midkine with embryonic neurons. Kaneda, Talukder, Ishihara, Hara, Yoshida, and Muramatsu. 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, p. 220, 108-112.
- Valeria Cagno, Eirini D. Tseligka, Samuel T. Jones, Caroline Tapparel. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *viruses*. 2019, 11(7): 596.
- .Lin Liu, Pradeep Chopra, Xiuru Li, Margreet A. Wolfert, S. Mark Tompkins, and Geert-Jan Boons. SARS-CoV-2 spike protein binds heparan sulfate in a length- and sequence-dependent manner. *bioRxiv. Preprint*. 2020 May, .doi: 10.1101/2020.05.10.087288.
- Courtney Mycroft-West, Dunhao Su, Stefano Elli, Scott Guimond, Gavin Miller, Jeremy Turnbull, Edwin Yates, The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding. *Biorxiv preprints*. 29 april 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.971093>.
- Wei Hao, Bo Ma, Ziheng Li, Xiaoyu Wang, Xiaopan Gao, Yaohao Li, Bo Qin, Shiyang Shang, Sheng Cui, Zhongping Tan. Binding of the SARS-CoV-2 Spike Protein to Glycans. .doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.17.100537>.
- Ludwig T. Weckbach, *Ulrich Grabmaier, Andreas Uhl, et al. Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis. *J Exp Med.* . 2019, 216(2): 350-368.
- Sui Huang, Arja Kaipainen, Michael Strasser, Sergio Baranzini. Mechanical Ventilation Stimulates Expression of the SARS-Cov-2 Receptor ACE2 in the Lung and May Trigger a Vicious Cycle. <https://www.preprints.org/manuscript/202005.0429/v1>. 2020050429 (doi: 10.20944/preprints202005.0429.v1). file:///Users/emanuela/Downloads/AdobeStock_333792641_Preview.jpeg.