



ARTICOL DE SINTEZĂ

Mecanisme patogenetice ale infecției cu SARS-CoV-2

Valeriu Cobet^{1*}, Ion Jeru², Victoria Rotaru¹, Lilia Tacu¹, Eleonora Bors¹, Stela Todiras¹, Corneliu Hangan¹

¹Catedra de fiziopatologie și fiziopatologie clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

²Catedra de oftalmologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 01.06.2020

Data acceptării spre publicare: 16.06.2020

Autor corespondent:

Valeriu Cobet, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Catedra de fiziopatologie și fiziopatologie clinică

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: valeriu.cobet@usmf.md

REVIEW ARTICLE

Pathogenetic mechanisms of SARS-CoV-2 infection

Valeriu Cobet^{1*}, Ion Jeru², Victoria Rotaru¹, Lilia Tacu¹, Eleonora Bors¹, Stela Todiras¹, Corneliu Hangan¹

¹Chair of pathophysiology and clinical pathophysiology, Nicolae Testemițanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

²Chair of ophthalmology, Nicolae Testemițanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 01.06.2020

Accepted for publication on: 16.06.2020

Corresponding author:

Valeriu Cobet, PhD, univ. prof.

Chair of pathophysiology and clinical pathophysiology

Nicolae Testemițanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: valeriu.cobet@usmf.md

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Patogenia leziunilor tisulare induse prin SARS-CoV-2 și a disfuncției poliorganice iminente COVID-19, inclusiv metoda declanșării răspunsului imuno-inflamator, a activării neuroendocrine, periclitării hemostazei etc. Cunoașterea limitată a fiziopatologiei COVID-19 îngustează calibrul abordărilor tratamentului patogenetic direcționat spre corectarea tulburărilor funcționale ale organelor vitale.

Ipoteza de cercetare

Exegeza datelor recent publicate privind mecanismele patogenetice dovedite și plauzibile, inerente fiziopatologiei COVID-19.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Răspunsul imuno-inflamator exagerat și nivelurile circulante elevate ale citokinelor proinflamatorii, activarea neuroendocrină asociată cu reducerea expresiei Ang (1-7), alterarea nemijlocită a endoteliocitelor și a diferitor celule ce exprimă ACE2 și CD209 (ex. macrofagele și mastocitele) sunt pârghii și mecanisme patogenetice cardinale de promovare și exacerbare a statusului fiziopatologic al COVID-19.

What is not known yet, about the topic

The pathogenesis of SARS-CoV-2-induced tissue damage and poliorganic dysfunction inherent to COVID-19, including the tackling of the immune-inflammatory response, neuroendocrine activation, hemostasis disorders etc. The limited knowledge of COVID-19 pathophysiology confines the calibre of approaches of pathogenic treatment directioned on correction of functional disorders of the vital organs.

Research hypothesis

Exegesis of recently published data regarding the plausible and proven pathogenetic mechanisms inherent to the pathophysiology of COVID-19.

Article's added novelty on this scientific topic

Exaggerated immune-inflammatory response and elevated circulating levels of proinflammatory cytokines, neuroendocrine activation associated with decreased Ang (1-7) expression, direct alteration of endotheliocytes and other cells expressing ACE2 and CD209 (e.g. macrophages and mast cells) are tools and pathogenetic mechanisms of promotion and exacerbation of the pathophysiological status of COVID-19.

Rezumat

Introducere. Evoluția disfuncției poliorganice în cadrul COVID-19, în special când impactul CoV-2 se impune pe fundalul unor precondiționări patologice (ex. diabet zaharat, obezitate, afecțiuni cardiovasculare, renale etc.), crește notabil rata mortalității pacienților. Acest fenomen justifică necesita-

Abstract

Introduction. The evolution of polyorganic dysfunction in COVID-19, especially when the impact of CoV-2 is imposed against the background of pathological preconditions (e.g. diabetes, obesity, cardiovascular and renal disorders etc.), significantly increases the mortality rate of patients. This phe-

tea explorării în regim de alertă a mecanismelor patogenetice iminente, pentru a consolida un algoritm concludent de predictor de prognoză, precum și ținte de profilaxie primară și secundară realizate prin tratament patogenetic.

Material și metode. Studiu de tip revistă de literatură. Cercetarea bibliografică s-a realizat în baza de date *PubMed*, aplicând cuvintele cheie: „SARS-CoV-2”, „COVID-19”, „immune-inflammatory response”, „cytokinetic storm”, „neuroendocrine activation”, „Ang 1-7”, „hemostasis disorders”, „ACE2 and CD209”. Au fost segregate publicațiile *in extenso* apărute în reviste recunoscute prioritar pe perioada ianuarie-mai 2020. Bibliografia finală a inclus 14 referințe.

Rezultate. În plan fiziopatologic, evoluția COVID-19 cuprinde, per ansamblu, 3 entități de evenimente consecutive: (1) invazia celulelor alveolare, în primul rând, pneumocitele de tip II și multiplicarea virusului ce rezultă într-un răspuns inflamator exagerat; (2) virusemia și (3) atacul CoV-2 asupra altor organe vitale, cum ar fi creierul, cordul și rinichii, celulele cărora exprimă receptorul de intrare a virusului în celulă, ACE2 și CD209. Defensiva imună compromisă are la bază limfocitopenia, iar creșterea marcată a expresiei citokinelor proinflamatoare este asociată de creșterea raportului Th1/Th2 și a celulelor de stimulare a coloniilor granulocitare și monocitare. Hipoxia determinată de procesul inflamator-proliferativ pulmonar conduce la activarea sistemului neuroendocrin (simpatico-adrenergic și endotelinic) pe fundalul dezechilibrului nativității funcționale a sistemului renin-angiotensin-aldosteron, datorată deprecierei Ang (1-7) în urma declinului cantitativ al ACE2 caracteristic procesului de internalizare a virusului în celulă. Carența de Ang (1-7) devine un mecanism patogenetic important al COVID-19, dată fiind la această conotație afectarea hemostazei plachetare și a tonusului vascular bazal, activarea expresiei metaloproteinazelor matricei extracelulare și a stresului oxidativ etc.

Concluzii. Internalizarea CoV-2 în celule este mediată prin receptorul ACE2 și activată de către receptorul AT1 al Ang II, iar în unele celule (ex. macrofage, dendrite, mastocite) și receptorul CD209 este implicat în acest proces. Activarea prin intermediul factorului nuclear kappa B a genelor proinflamatoare rezultă în sinteza exagerată de mediatori ai inflamației, iar „furtuna citokinică” este un mecanism care potențează efectele virusemiei asupra homeostaziei generale. Hipoxia, hipercatecholaminemia, acidoza și deficitul de Ang (1-7) formează o interfață patogenetică cheie privind manifestările cerebrale, cardiace și renale proprii COVID-19.

Cuvinte cheie: SARS-CoV-2, COVID-19, ACE2, Ang (1-7), „furtuna citokinică”.

Introducere

Omenirea trăiește astăzi momente marcate de o suferință de proporții globale datorată acțiunii unui virus cu o etimologie a cuvântului (CORONA) determinată de aspectul microscopic (*halo solar*) al acestui reprezentant din familia virusurilor cu genom ARN și nu de intenții nobile, care răpune zi de zi mii de vieți umane pe toate meridianele planetei. Din familia mare de coronavirusuri, 7 tipuri demonstrează un impact asupra

nomenon justifies the need for alert exploration of imminent pathogenetic mechanisms, as well as to consolidate a conclusive algorithm of prognostic predictors, as well as targets for primary and secondary prophylaxis achieved by pathogenetic treatment.

Material and methods. It is a study of literature review. The literature search was performed in the PubMed database, applying the keywords: “SARS-CoV-2”, “COVID-19”, “immune-inflammatory response”, “cytokinetic storm”, “neuroendocrine activation”, “Ang (1-7)”, “hemostasis disorders”, “ACE2 and CD209”. The *in extenso* publications issued in recognized journals for the period January-May 2020 have been segregated. The final bibliography included 14 references.

Results. In the pathophysiology field the evolution of COVID-19 includes mostly 3 entities of consecutive events: (1) the invasion of alveolar cells (primarily pneumocytes type II) and the replication of the virus resulting in an exaggerated inflammatory response; (2) viremia and (3) the CoV-2 attack on other vital organs, such as the brain, heart and kidneys, the cells of which express the receptor for the virus entering into cell such as, ACE2 and CD209. The impaired immune defense is based on lymphocytopenia, but the marked increase of the proinflammatory cytokine expression is associated with both increased Th1/Th2 ratio and granulocyte and monocyte colony stimulating cells. Hypoxia caused by the pulmonary inflammatory-proliferative process leads to the activation of the neuroendocrine system (sympathetic-adrenergic and endotelinic) in contiguity to imbalance of the functional nativity of the renin-angiotensin-aldosterone system, due to the Ang (1-7) decline following the ACE2 internalization in the cell. Ang (1-7) deficiency becomes an important pathogenetic mechanism of COVID-19, given at this connotation the impairment of platelet hemostasis and basal vascular tone, activation of extracellular matrix metalloproteinases expression and oxidative stress etc.

Conclusions. CoV-2 internalization in cells is mediated by the ACE2 receptor and activated by the Ang II AT1 receptor, and in some cells (e.g. macrophages, dendrites, mast cells) the CD209 receptor is involved in this process. Activation of proinflammatory genes by the nuclear factor kappa B results in exaggerated synthesis of inflammation mediators, and the “cytokine storm” is a mechanism that boosts the effects of viremia on general homeostasis. Hypoxia, hypercatecholaminemia, acidosis and Ang (1-7) deficiency consolidate a key pathogenetic interface for COVID-19’s concerning the cerebral, cardiac and renal manifestations.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, ACE2, Ang (1-7), cytokinetic storm.

Introduction

Humanity is living today marked moments of suffering with global proportion, caused by virus with an etymology of the word (CORONA) determined by the microscopic aspect of it (*halo solar*) from the viruses family with RNA genome but not by the noble intentions, that kills thousands human lives day by day on all meridians of the planet. From the big family of corona-viruses, 7 types demonstrate impact on the human

organismului uman, ținta primară fiind sistemul respirator; 3 din care provoacă afecțiuni serioase, cum ar fi, sindromul respirator acut sever (SARS – *Severe Acute Respiratory Syndrome*). Altele 4 tipuri se impun prin afecțiuni ușoare în care domină pattern-ul răcelii.

Pandemia actuală este provocată de coronavirusul înrudit cu cel care a produs epidemia de SARS din 2002-2003 (tipul 1 / versiunea 1 de coronavirus sau CoV-1) și este, astfel, acceptat drept CoV-2. De menționat, CoV-2 nu este urmașul lui CoV-1, ambele tipuri având un strămoș comun. Tipul 3 de coronavirus este responsabil de MERS (sindromul respirator din Orientul Mijlociu – *Middle East Respiratory Syndrome*) din 2012 și identificat, respectiv, ca MERS-CoV.

Sintagma COVID-19 demarcă 2 entități: (1) 19 – anul apariției (primul caz apărut în decembrie 2019, în Wuhan, China) și (2) calibrele afecțiunii corpului omenesc, care depășește sistemul respirator și periclitează în mod direct sau indirect alte organe vitale, de ex. cordul, rinichii, ficatul [1, 2, 3], definind, astfel, statusul de boală a virusului CoV-2 – COVID (*CO*rona *V*irus *D*isease). Prin urmare, este iminentă simptomatologia versatilă a COVID-19, iar manifestările clinice la noima severității și prognosticului lor sunt dependente de fezabilitatea de protecție și adaptiv-compensatorie a homeostaziei.

Dincolo de lipsa unui tratament antiviral specific eficient (anti-CoV-2), evoluția severă a infecției și mortalitatea înaltă, anunțată la cote de 3-4%, sunt determinate și de lipsa unui tratament aplicat asupra mecanismelor responsabile de declanșarea și exacerbarea manifestărilor clinice cu impact notabil asupra supraviețuirii organismului. Astfel, elucidarea acestor mecanisme a desemnat una din prioritățile medicinei mondiale la ora actuală, angrenând în procesul de cercetare specialiști de pe toate continentele. Scopul acestui articol a constat în exegeza mecanismelor patogenetice abordate și dovedite în studiile recente consacrate infecției cu CoV-2.

Material și metode

Studiu de tip revistă de literatură. Cercetarea bibliografică s-a realizat în baza de date *PubMed*, aplicând cuvintele cheie: „SARS-CoV-2”, „COVID-19”, „immune-inflammatory response”, „cytokinic storm”, „neuroendocrine activation”, „Ang (1-7)”, „hemostasis disorders”, „ACE2 and CD209”. Au fost segregate publicațiile *in extenso* apărute în reviste recunoscute, prioritar pe perioada ianuarie-mai 2020. Bibliografia finală a inclus 14 referințe.

Rezultate

Căile respiratorii reprezintă poarta de intrare a CoV-2 (ex. inhalarea aerosolului răspândit prin strănutul pacientului infectat cu sau fără simptomatologie, aflat în apropierea <1 m), și astfel, primele celule gazde utilizate de virus pentru multiplicare sunt celulele sistemului pulmonar. Respectiv, afecțiunea pulmonară este primară, iar SARS se asociază într-un număr mare de cazuri. Pneumonia virală și sindromul detresei respiratorii acute influențează în mod ultimativ prognosticul pacientului cu COVID-19.

Ajuns cu aerul inhalat în alveole, CoV-2 începe asediul celu-

body, the primary target being respiratory system; three of them provoke serious disorders, like as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Other four types lead to mild disorders as patterns of flu.

The actual pandemic situation is triggered by coronavirus related with that provoked epidemic of SARS in 2002-2003 (type 1 or version 1 coronavirus or CoV-1), so in this case is accepted like CoV-2. It's important to mention that CoV-2 is not the CoV-1 successor, both types have a common progenitor. Type 3 of coronavirus is responsible for developing of MERS (Middle East Respiratory Syndrome) identified, respectively as MERS-CoV in 2012.

Syntagma COVID-19 demarks 2 entities: (1) 19 – the year of onset (the first case have been reported in December 2019, in Wuhan, China) and (2) calibre of affection of human body, which exceeds respiratory system and direct or indirect damage other vital organs, e.g. heart, kidneys, liver [1, 2, 3], thus defining the disease status of virus CoV-2 – COVID (*CO*rona *V*irus *D*isease). Therefore, it is imminent versatile symptomatology of COVID-19, but the severity and prognostic of clinical manifestations are dependent on protective and adaptive compensatory feasibility of homeostasis.

Beyond lack of specific efficient antiviral treatment (anti-CoV-2) the severe evolution of infection and higher mortality rate, reported in proportion of 3-4%, are determined also by the lack of treatment applied to the mechanisms that are responsible for the developing and exacerbation of clinical manifestations with notable impact on the organism's survivor. Thus, elucidation of these mechanisms is one of the priorities of the world wide medicine today, involving in research process specialists from all the continents. The aim of this article was in the exegesis of pathogenetic mechanisms addressed and proven in recent studies of CoV-2 infection.

Material and methods

It is a study of literature review. The literature search was performed in the *PubMed* database, applying the keywords: “SARS-CoV-2”, “COVID-19”, “immune-inflammatory response”, “cytokinic storm”, “neuroendocrine activation”, “Ang (1-7)”, “hemostasis disorders”, “ACE2 and CD209”. The *in extenso* publications issued in recognized journals for the period January-May 2020 have been segregated. The final bibliography included 14 references.

Results

The respiratory pathways represent the portal of entry of CoV-2 (i.e. inhalation of aerosols derived from patient's sneezing infected with or without evident symptomatology, being at the distance <1 m), and thus the primary host cells used by virus for multiplication are the cells of pulmonary system. Respectively, the pulmonary disorder is the primary, but SARS which associate a huge number of viral pneumonia cases and acute respiratory distress syndrome ultimately influences the prognosis of patient with COVID-19.

Once arrived with the inhaled air in the alveolus, CoV-2

lelor alveolare pentru realizarea multiplicării în celula gazdă, aranjament facilitat de: (1) atingerea în cavitatea alveolară a unei concentrații superioare a virusului din tot itinerarul respirator și (2) celulele accesibile pentru virus exprimă pe suprafața membranei receptorul (endopeptidaza ACE2) care asigură pasajul lui intracelular, cum ar fi pneumocitele de tip I (aranjate într-un strat și responsabile de schimbul de gaze), pneumocitele de tip II (responsabile de sinteza surfactantului) și macrofagele alveolare. Receptorul membranar ACE2 (*Angiotensine Converting Enzyme type 2*) este expresat de un set mare de celule (cord, endoteliu vascular, creier, rinichi, testicule, intestin etc.), iar în sânge poate fi decelat și receptorul solubil ACE2, decuplat de membrana celulară prin intermediul dezintegrinei și metaloproteinazei-17 [4]. De menționat, în acest context, că și pentru tulpinile SARS-CoV-1 (structura SARS-CoV-1 la cote de 76% coincide cu cea a SARS-CoV-2) și NL63 este dovedit rolul ACE2 în infectarea celulelor gazde, iar hematiile nu expresează ACE2. Se anunță importantă expresia receptorului ACE2 și de către celulele mucoasei cavității bucale, în special, ale limbii [5]. Deci, cavitatea orală merită atenție în vederea riscului infectării persoanelor și desemnării metodelor de protecție.

În mod sinoptic, impactul CoV-2 asupra organismului uman poate fi, în plan fiziopatologic, jalonat în câteva faze cheie:

- pasajul virusului în celulă (infectarea celulelor alveolare);
- multiplicarea intracelulară a virusului;
- declanșarea răspunsului imuno-inflamator și angrenarea din sânge a celulelor proinflamatoare;
- exocitoza virusului, atacul celulelor vecine, pătrunderea în sânge, diseminarea lui și infectarea celulelor altor organe și sisteme, care expresează ACE2, determinând, astfel, complexitatea clinică iminentă COVID-19.

Infectarea celulei cu SARS-CoV-2, mai multe fațete patogenice ale ACE2

Receptorul ACE2 a fost descoperit în anul 2000 de 2 grupuri independente de cercetători drept o glicoproteină transmembranară (monocarboxipeptidază) compusă din 805 de aminoacizi care utilizează o bornă extracelulară cu acțiune proteolitică în vederea înlăturării unui aminoacid din extrema dreaptă a lanțului octapeptidului Ang II, rezultând în formarea Ang (1-7). Deși structura ACE2 copiază la cote de 40% structura ACE1 (dipeptidază), inhibitorii acesteia din urmă nu acționează similar asupra ACE2 (unitățile catalitice ale enzimelor sunt diferite). Pneumocitele alveolare de tip II expresează la o scară mai mare (de 3-5 ori) ACE2 comparativ cu pneumocitele de tip I și macrofagele alveolare. Cu toate acestea, în cercetările realizate pe culturi de celule, s-a demonstrat că gradul de infectare a pneumocitelor de tip II cu SARS-CoV-2 este de, cel puțin, 10 ori mai mare față de pneumocitele de tip I și macrofage, fapt ce poate indica asupra fenomenului unei afinități distincte a ACE2. Remarcabil că expresia ACE2 de către pneumocitele de tip II a fost în cultură de celule augmentată prin acțiunea IL-1.

SARS-CoV-2 recunoaște receptorul ACE2 prin intermediul proteinei S (Spike), format din 2 subunități (S1 și S2) care se

starts to reside in the alveolar cells for achieving the multiplication of it in the host cell, being facilitated by: (1) reaching of a higher concentration of virus in the alveolar cavity and (2) the accessible cells for the virus express on their surface the membrane receptor (endopeptidase ACE2) which assures the passage of it intracellular, like as type I pneumocytes (disposed in one layer and responsible for gases exchange), type II pneumocytes (responsible for surfactant synthesis) and alveolar macrophages. The membrane receptor ACE2 (*Angiotensine Converting Enzyme type 2*) is expressed by a huge number of cells (heart, vascular endothelium, brain, kidneys, testes, intestine etc.), but in the blood also can be detected and soluble receptor ACE2, decoupled from cellular membrane by the disintegrin and metalloproteinase-17 [4]. In this context, it should to be mentioned, that for the other strains as SARS-CoV-1 (structure of SARS-CoV-1 in rate of 76% coincides with that of SARS-CoV-2) and NL63 is demonstrated the role of ACE2 in infection of host cells, but the red blood cells don't express ACE2. It is announced important the expression of receptor ACE2 also on the cells of the mucosal oral cavity, special of the tongue [5]. So, the oral cavity deserves attention in view of risk infection of people and designation of protection methods.

Synoptically, the impact of CoV-2 on the human body can be pathophysiologically marked in some key events:

- passage of virus in the cell (infection of alveolar cells);
- intracellular multiplication of virus;
- triggering the immune-inflammatory response and involvement of pro-inflammatory blood cells;
- exocytosis of virus, attack of neighbouring cells, realising in the blood, disseminated of it and infection of other organ and system cells, which express ACE2, thus determining the imminent clinical complexity of COVID-19.

The infection of cells with SARS-CoV-2: more pathogenic aspects of ACE2

The receptor ACE2 was discovered in 2000 by 2 independent groups of scientists, as a transmembrane glycoprotein (monocarboxypeptidase) composed from 805 aminoacids which used an extracellular hallmark with proteolytic action for removing one aminoacid from the right extreme of octapeptide chain of Ang II, results in formation of Ang (1-7). Although the structure of ACE2 copy the structure of ACE1 (dipeptidase) in proportion of 40%, inhibitors of it don't act similar on ACE2 (the catalytic unites of enzymes are different). The alveolar type II pneumocytes express in higher rate (more than 3-5 times) ACE2 comparing with the type I pneumocytes and alveolar macrophages. Nevertheless, in the researchers realised on cell cultures, has been demonstrated, that the infection degree of type II pneumocytes with SARS-CoV-2 is at least 10 times greater than of type I pneumocytes and alveolar macrophages, which may indicate the phenomena of a distinct affinity to ACE2. Remarkably, that expression of ACE2 by the type II pneumocytes had been augmented by the action of IL-1.

SARS-CoV-2 recognises the receptor ACE2 through protein S (Spike) composed from 2 subunits (S1 and S2) which are ex-

expresează pe anvelopa lipidică subțire a virusului ce acoperă capsida proteică, învelișul protector interior al genomului ARN.

Prima etapă de pătrundere a virusului este declanșată de legătura segmentului N-terminal al proteinei S1 cu receptorul ACE2 și așezarea S1 în locusul respectiv, accesând RBD (*Receptor Binding Domain*).

A doua etapă, care se anunță cea mai importantă pentru intrarea virală, este clivarea septului proteic dintre unitățile S1 și S2, proces operat de cathepsină și de TMPRSS-2, o protează transmembrană serină 2 (*Trans Membrane Protease Serine*), un membru al subfamiliei Hepsin / TMPRSS. După clivare, subunitatea S2 suferă o rearanjare conformațională care asigură fuziunea între membrana virală și celulară, proces care se soldează cu intrarea (gen endocitoză sau fuzionare) a complexului virus-ACE2 în celulă, unde sub acțiunea proteazelor intracelulare aceasta disociază, iar structurile virusului sunt angrenate în evenimente tipice virusurilor cu genom ARN. Se consideră că procesul de fuziune în celulă a complexului virus-ACE2 este facilitat de către receptorul AT1 al Ang II, care se expresează în vecinătatea receptorului ACE2. Mai mult decât atât, creșterea expresiei și/sau a activității receptorului AT1 conduce la creșterea expresiei ACE2, iar blocarea AT1 are efect în detrimentul endocitozei complexului SARS-CoV-2-ACE2 și reduce, prin urmare, capacitatea de infectare a virusului.

Remarcabil este că internalizarea în celulă a receptorului ACE2 de care este ancorat CoV-2 nu se finalizează prin reîntoarcerea receptorului pe suprafața membranei celulare (gen fezabilitatea funcțională a receptorului către LDL-colesterol). Anume acest fenomen, constatat în culturile celulare, de reducere a expresiei ACE2 după expunerea la virus a celulei, a fost una din dovezile privind rolul receptorului ACE2 în infectarea celulară, confirmată, ulterior, și prin reducerea capacității virusului de infectare a celulelor în condițiile de blocare a ACE2 cu antagonistul specific MLN-4760.

Sub acest aspect, se anunță a fi însemnate 2 ipoteze fiziopatologice:

1) Pacienții cu hipertensiune arterială, insuficiență cardiacă cronică, diabet zaharat care administrează remedii ce conduc la creșterea expresiei ACE2 (ex. inhibitorii ACE1 și/sau antagoniștii receptorului AT1 al Ang II), sunt predispuși la o infectabilitate cu SARS-CoV-2 majorată. Această afirmație derivă din evidențele obținute în cercetările experimentale efectuate, inclusiv pe animale transgenice (cu diferite modele de *knockout*), potrivit cărora elevarea conținutului de Ang II și a expresiei receptorilor AT1 conduce la micșorarea (*down regulation*) expresiei ACE2. La ora actuală, opiniile rămân, totuși, împărțite în vederea atitudinii față de tratamentul cu inhibitorii ACE1 și sartane, deși studiile fundamentale demonstrează efectul antiinflamator al sartanelor în modelul murin de SARS-CoV-2 [6]. Mai mulți experți în domeniu coroborează opinia, că sistarea tratamentului cu inhibitorii ACE1 și/sau sartane la pacienții cu afecțiuni cardiovasculare, inclusiv, asociate de diabet zaharat, nu este justificată și poate agrava evoluția COVID-19. La această noimă este inteligibilă acțiunea benefică a sartanelor prin prisma participării receptorilor AT1 în fuziunea intracelulară a virusului CoV-19 asistată de către

pressed on the thin lipid envelope of virus which covers the capsid proteins, which are the protective interior coat of RNA genome.

The first stage of virus entry is triggered by attaching of N-terminal segment of protein S1 to the receptor ACE2 and localisation of S1 in its niche, accessing the RBD (Receptor Binding Domain).

The second stage, which is the most important for the virus entry, it is cleavage of protein septum between S1 and S2, the process operated by cathepsin and by TMPRSS-2 (a transmembrane protease serine), a member of subfamily Hepsin / TMPRSS. After cleavage, subunit S1 suffer a conformational rearrangement which assure the fission between viral and cellular membrane, process which results with entrance (such as endocytosis or fusion) of complex virus – ACE2 into the cell, where under the action of intracellular proteases dissociates, but virus structures are involved in events typical for viruses with RNA genome. It is considered that fusion process into the cell of the complex virus – ACE2 is facilitated by the receptor AT1 of the Ang II, which is expressed in the vicinity of receptor ACE2. More than that, increasing expression and/or of receptor AT1 activity leads to increasing expression of ACE2, but inhibition of AT1 has detrimental effect on endocytosis of complex SARS-CoV-2-ACE2 and thus reducing capacity of virus infection.

Remarkably that, internalisation into the cell of the receptor ACE2 anchored with CoV-2 it is not completed by the returning of the receptor on the cellular membrane (such as functional feasibility of the receptor to LDL-cholesterol). Special this phenomenon, noted in cell culture (reduction of ACE2 expression after cell exposure to the virus), was one of the evidences regarding the role of ACE2 in cellular infection, and subsequently was confirmed by reducing the ability of the virus to infect cells under conditions of blocking ACE2 with specific antagonist MLN-4760.

So, this aspect designed two pathophysiological hypotheses:

1) Patients with arterial hypertension, chronic heart failure, diabetes mellitus which administrate drugs leading to overexpression of ACE2 (e.g. inhibitors of ACE1 and/or antagonists of receptor AT1 of Ang II), in such way are predisposed to a higher rate infection with SARS-CoV-2. This affirmation derived from the obtained evidences of experimental researchers, inclusive performed also on the transgenic animals (with different patterns of knockout), according to which increasing ratio of Ang II and expression of receptor AT1 lead to down regulation of ACE2 expression. Currently, the opinions are divided regarding the treatment with inhibitors ACE1 and sartans, although the fundamental studies demonstrate the anti-inflammatory effect of sartans in murine model of SARS-CoV-2 [6]. Several experts from domain confirm the opinion that stopping treatment with inhibitors ACE1 and/or sartans on patients with cardiovascular disorders, inclusive those associated with diabetes mellitus, it is not justified and can worsen the evolution of COVID-19. In this sense, it is intelligible the beneficial action of sartans in terms of the participation of AT1 receptors in the intracellular fusion of the CoV-19 virus

receptorul ACE2, iar beneficiul inhibitorilor ACE1 poate avea repere de sprijin nu numai prin prisma diminuării sintezei de Ang II, dar și creșterii degradării octapeptidului de către monocarboxipeptidază, soldată cu formarea unor reprezentanți al sistemului renin-angiotensin-aldosteron cu valențe biologice deosebite – Ang (1-7).

2) Micșorarea expresiei ACE2 în urma internalizării în celulă a receptorului, declanșată de către SARS-CoV-2, are drept urmare formarea depreciată a Ang (1-7) care, prin intermediul receptorilor Mas (abolirea genei Mas anihilează acțiunile heptapeptidului, fapt ce a determinat și denumirea acestui receptor expresat pe mai multe tipuri de celule), induce efecte benefice, opuse celor inerente acțiunii Ang II mediate prin receptorii AT1 (Figura 1).

Astfel, SARS-CoV-2 diminuează cantitativ Ang (1-7) și prin aceasta limitează efectele benefice ale heptapeptidului me-

asistat de ACE2 receptor, dar avantajul ACE1 inhibitorilor poate avea suport landmarkuri nu numai prin prisma scăderii sintezei de Ang II, dar și prin creșterea degradării octapeptidului de către monocarboxipeptidază, rezultând în formarea unui agent din sistemul renin-angiotensin-aldosteron cu valențe biologice speciale – Ang (1-7).

2) Scăderea expresiei ACE2 după internalizarea în celulă a receptorului declanșată de SARS-CoV-2 rezultă în depreciată formarea de Ang (1-7), care prin receptorii Mas (diminuarea genei Mas anihilează acțiunile heptapeptidului, fapt ce a determinat și denumirea acestui receptor expresat pe mai multe tipuri de celule) induce efecte benefice, opuse celor inerente acțiunii Ang II mediate prin receptorii AT1 (Figura 1).

Prin urmare, SARS-CoV-2 diminuează cantitativ Ang (1-7) și prin aceasta limitează efectele benefice ale heptapeptidului mediate prin receptorii Mas, care sunt exprimate în prioritate pe

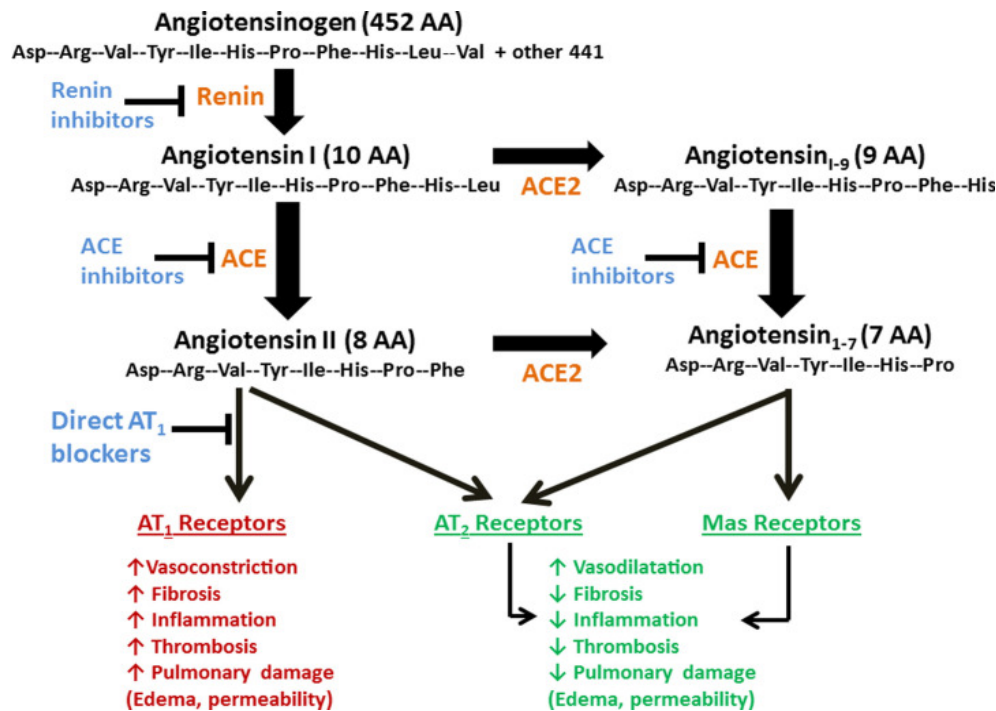


Fig. 1 Schema formării Ang (1-7) și efectele ei versus efectele Ang II, mediate prin AT1 [4].

Fig. 1 The scheme of Ang (1-7) formation and its effects versus effects of Ang II mediated by AT1 [4].

diat prin receptorii Mas, exprasați prioritar pe endoteliocitele vasculare: antiinflamator, antifibrotic, antitrombotic, antioxidant, antiproliferativ, vasodilatator, stabilizator al permeabilității vasculare etc. Aceste repercusiuni formează o interfață patogenetică importantă privind declanșarea și sustenabilitatea manifestărilor clinice ale COVID-19 urmărite nu doar la nivelul sistemului pulmonar și explică de ce la pacienții cu afecțiuni endoteliale (diabet zaharat, obezitate) impactul CoV-2 este, comparativ, mai puternic. Interesante sunt datele experimentale care arată că reproducerea obezității în modelul murin (adipocitele expresează ACE2 și produc Ang (1-7)) se impune prin micșorarea nivelului circulant al Ang (1-7) și majorarea Ang II doar la șoricelii masculi, iar după ovariectomie, diferențele de gender au dispărut.

the vascular endotheliocytes: anti-inflammatory, anti-fibrotic, anti-thrombotic, antioxidant, anti-proliferative, vasodilator, stabilizer of vascular permeability etc.

These repercussions constitute an important pathogenic interface regarding the onset and sustainability of clinical manifestation of COVID-19 observed not only at the level of pulmonary system and explains why in the patients with endothelial disorders (diabetes mellitus, obesity) the impact of CoV-2 it is comparatively stronger. There are interesting experimental data which shows that obesity reproduction in murine model (adipocytes express ACE2 and produces Ang (1-7)) it is imposed by decreasing the circulating level of Ang (1-7) and increasing Ang II only in male mice, and after ovariectomy the gender differences disappeared.

Receptorii Mas sunt expresați și pe trombocite, iar activarea lor de către Ang (1-7) se impune prin producția de prostaciclina (PGI₂) și oxid nitric (NO) care inhibă activitatea de adeziune și agregare a plachetelor. Pe de altă parte, micșorarea Ang (1-7) pe contul declinului ACE2 este însoțită de majorarea Ang II, octapeptid cu capacitate notabilă de activare a macrofagelor alveolare și producției citokinelor proinflamatoare [7].

Multiplicarea SARS-CoV-2, răspunsul imun-inflamator pulmonar și diseminarea lui prin furtuna de citokine

Multiplicarea primară a CoV-2 în celulele sistemului respirator (epiteliocitele tractului respirator superior și bronchiolare, pneumocitele alveolare de tip I și, în special, de tip II) se produce după pattern-ul biologic caracteristic virusului cu genom ARN. Lanțul ARN viral format din circa 30.000 de nucleotide codifică proteine de structură importante în biologia virusului, proteine cu acțiune enzimatică (ex. transcriptazele), importante în multiplicare și proteine fără semnificație în procesul de multiplicare în celula gazdă în mediul de cultură, dar importante în condiții *in vivo*. Asamblarea tuturor proteinelor sintetizate de ribozomii celulei gazdă sub comanda ARN-ului viral, mediată de ARN-polimeraza în structura CoV-2, se produce în reticulul endoplasmic și aparatul Golgi, iar veziculele înmagazinate cu virus vor părăsi celula gazdă prin exocitoză, pentru a asedia și invada celulele vecine (Figura 2) [8].

Evident, dacă sunt condiții de pătrundere a virusului în sânge, create prin declanșarea răspunsului inflamator, atunci se va produce diseminarea infecției cu atacul CoV-2 asupra diferitor organe vitale, celulele cărora expresează ACE2.

Receptors Mas are expressed also on platelets and their activation by Ang (1-7) it is imposed by production of prostacyclin (PGI₂) and nitric oxide (NO) that inhibit adhesion and aggregation activity of platelets. On the other hand, decreasing Ang (1-7) due to decline of ACE2 it is accompanied by an increase of Ang II, octapeptide with notable capacity of alveolar macrophage activation and production of pro-inflammatory cytokines [7].

Multiplication of SARS-CoV-2, pulmonary immune-inflammatory response and his dissemination through the cytokine storm

Primary multiplication of CoV-2 in the cells of respiratory system (epitheliocytes of superior respiratory system and bronchiolar, alveolar pneumocytes type I and special type II) it is producing according to the characteristic pattern for the RNA genome viruses. The viral ARN chain composed from approximately 30.000 nucleotides codifies structure proteins that are important in virus biology, proteins with enzymatic activity (e.g. transcriptase) important in multiplication, and other proteins without significant role in multiplication process in host cell in culture environment, but important *in vivo* condition.

The assembling of all proteins synthesised by cell host ribosome under the control of viral RNA mediated by RNA-polymerase in structure of CoV-2 it is produced in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, but the vesicles with sequestered virus will leave the host cell by exocytosis for reside and invade the neighbouring cells (Figure 2) [8].

Evidently, if exists condition of virus penetration in blood-

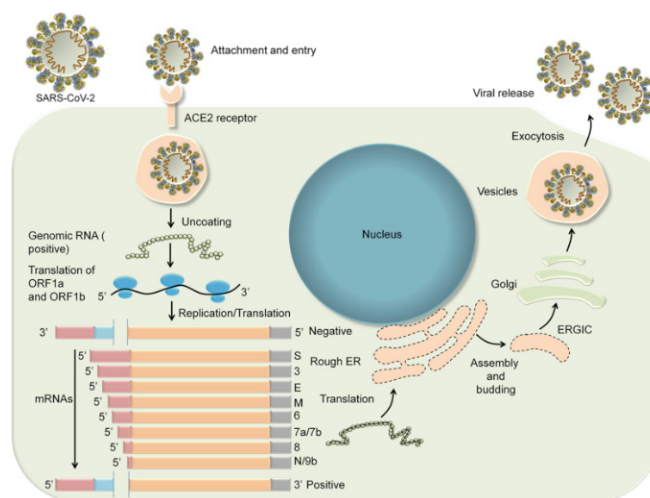


Fig. 2 Schema sinoptică de intrare, multiplicare și ieșire din celulă a SARS-CoV-2 [8].

Fig. 2 Synoptic scheme of entry, multiplication and exit from the cell of SARS-CoV-2 [8].

Răspunsul imuno-inflamator este mecanismul oportun în declanșarea injuriilor tisulare, reacțiilor vasculare locale și generale și manifestărilor clinice proprii COVID-19. La nivelul alveolar acesta evoluează pe mai multe paliere.

Multiplicarea CoV-2 în pneumocitele de tip I și tip II se impune prin afectarea progresivă a plasticității celulelor, ce în final rezultă în distrucția lor și eliberarea mediatorilor inflamației, DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*), ce repre-

stream, created by initiation of inflammatory response, then it will happen spread of infection with the CoV-2 attack on various vital organs, the cells of which express ACE2.

The immune-inflammatory response is the opportune mechanism in triggering tissue injuries, local and general vascular reactions and clinical manifestations proper of COVID-19. At the alveolar layer evaluates by several pathways.

Multiplication of CoV-2 in pneumocytes type I and II is

zintă epave membranare și fragmente de structuri de organele ale celulei gazdă. Prin activarea receptorilor Toll-like expesați pe membrana celulelor vecine, DAMP produce activarea programului genetic pro- și anti-inflamator, mediat prin NF-kappa B (factorul nuclear kappa B) și sistemul de proteinkinaze (ex. *akt* sau protein-kinaza B). În mod analog, programul genetic inflamator se activează sub acțiunea mediatorilor PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), care reprezintă epave de ARN viral și care pot induce transcripția genetică și prin receptorii intracelulari (ex. NOD-like, *Nucleotide-Binding-Domain* receptor). Drept urmare, celula începe să elibereze citokine pro-inflamatoare (ex. TNF- α) și interferonul- α (INF- α), factorul principal de protecție antivirală pentru celulele care nu au fost încă atacate de CoV-2 și care expresează pe suprafața membranei receptori față de INF- α .

Eliberarea interferonului poate fi în cadrul acțiunii SARS-CoV-2 declanșată odată cu stimularea receptorului ACE2, care se soldează cu activarea genei INF [9]. Dar tributul pentru acest beneficiu aparent este plătit dublu: (1) INF- α crește expresia receptorilor ACE2 de pe suprafața celulelor vecine și (2) INF- α stimulează macrofagele alveolare în vederea eliberării de citokine proinflamatoare, în primul rând, proteinele macrofagelor de stimulare a inflamației, MIP-1 α (CCL3) și MIP-1 β (CCL4), IL-7 și CXCL10 (chemokina dependentă de interferon).

Macrofagele alveolare expresează diferite familii de receptori transmembranari Toll-like (ex. TLR-2, TLR-4, TLR-8), care fiind activați de DAMP, induc producția stocului principal de citokine, cele mai importante fiind interleukinele din familia IL-6, TNF- α , IL-1, IL-8, IL-29, factorul de stimulare a fibroblastelor (FGF-2), factorul de expresie a moleculelor de adeziune intercelulară expresate pe endoteliul vascular etc.

Repercusiunile principale ale acțiunii citokinelor asupra microcirculației alveolare sunt după entitatea sa fiziopatologică mecanisme însemnate de susținere și agravare a răspunsului inflamator: (1) creșterea permeabilității; (2) extravazarea lichidului; (3) migrarea transendotelială a celulelor albe (neutrofilele și monocitele).

Creșterea permeabilității vasculare este rezultatul acțiunii nu numai a IL-1 și TNF- α (citokinele cu capacitate concludentă, în acest sens), dar și a bradikininei, care din cauza reducerii expresiei ACE2, odată cu internalizarea ireversibilă a receptorului indusă de CoV-2, se acumulează în zona inflamației. Remarcabil, că citokinele proinflamatoare cresc expresia receptorilor endoteliali B1 către bradikinină, activarea cărora conduce la 2 evenimente cu conotație patogenetică în vederea extravazării lichidului: (1) dilatarea arteriolelor și elevarea presiunii hidrostactice și (2) sferocitizarea endoteliocitelor, creșterea spațiului interendoteliocitic, și respectiv, a permeabilității vasculare. Van de Veerdonk *et al.* (2020) consideră, că blocarea receptorilor B1 ar fi o opțiune terapeutică fezabilă a edemului pulmonar la pacienții cu COVID-19, mai ales că edemul pulmonar dependent de bradikinină este rezistent la administrarea corticosteroizilor [10]. Mai mult, octapeptidul este responsabil de declanșarea reflexului de tuse uscată, aferentele căruia se împletesc la nivelul treimeii superioare a alveolei.

Extravazarea lichidului, facilitată de creșterea permeabili-

imposed by the progressive impairment of cell plasticity, that finally resulting in their destruction and realizing of inflammatory mediators, DAMP (Damage Associated Molecular Pattern), that represent debris of damaged membranes and fragments of organelle structure of host cell. By the activation of Toll-like expressed on the membrane of neighbouring cells, DAMP trigger activation of genetic pro- and anti-inflammatory program, mediated by NF-kappa B (nuclear factor kappa B) and by proteinkinase system (e.g. *akt* or protein-kinase B). In the same manner the genetic inflammatory program is activated under the action of mediators PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern), which represent debris of viral RNA and which can induce genetic transcription also by intracellular receptor (e.g. NOD-like, Nucleotide-Binding-Domain receptor). As a consequence cells start to realise pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF- α) and interferon- α (INF- α), important factor of antiviral protection for cells that have not yet been attacked by CoV-2 and which express on their membrane surface receptors for INF- α .

The realising of interferon can be during action of SARS-CoV-2 triggered in the same time with expression of ACE2, which results in activation of INF gene [9]. But the sacrifice for this apparent benefit is paid double: (1) INF- α increases expression of ACE2 receptor on the surface of neighbouring cells and (2) INF- α stimulates alveolar macrophages for realising of pro-inflammatory cytokines, mainly proteins of macrophages that stimulate inflammation, MIP-1 α (CCL3) and MIP-1 β (CCL4), IL-7 and CXCL10 (dependent chemokine on interferon).

The alveolar macrophages express different transmembrane Toll-like receptors (e.g. TLR-2, TLR-4, and TLR-8), which being activated by DAMP, realise the main stock of cytokines, the most important are interleukin family IL-6, TNF- α , IL-1, IL-8, IL-29, fibroblast growth factor (FGF-2), factor expression of adhesion intercellular molecules expressed on the vascular endothelium etc.

The main effects of cytokines on the alveolar microcirculation, according to the pathophysiologic entity, are significant mechanism for supporting and worsening the inflammatory response: (1) increase permeability; (2) extravasation of liquid and (3) trans-endothelial migration of white blood cells (neutrophils and monocytes).

The increasing vascular permeability is the result of action not only of IL-1 and TNF- α (cytokines with decisive capacity in this view), but also of bradykinin, which in condition of reducing expression of ACE2 due to irreversible internalisation induced by CoV-2, it is accumulated in the focus of inflammation. It is remarkable, that pro-inflammatory cytokines increase expression of endothelial receptor B1 for bradykinin, which activation lead to couple of events with pathogenetic connotation in extravasation of fluid: (1) arteriolar dilation and elevation of hydrostatic pressure and (2) change the endotheliocytes shape in spherical one, increase inter-endothelial space and, respectively vascular permeability.

Van de Veerdonk *et al.* (2020) consider that inhibition of receptor B1 will be a feasible therapeutic option of pulmonary edema in patients with COVID-19, especially that bradykinin dependent pulmonary edema is resistant to administration of

tății și presiunii hidrostatice capilare, induce acumularea de lichid în interstițiul pulmonar (edem interstițial) și, ulterior, în alveole (edem pulmonar sau alveolar), care reprezintă un mecanism patogenetic cardinal al sindromului detresei respiratorii acute. Creșterea permeabilității alveolare este, de asemenea, propice dezvoltării edemului pulmonar și se datorează acțiunii proteazelor, histaminei și leucotrienelor (LTC₄), eliberate de mastocitele care expresează ACE2 și pot asigura sinteza *de novo* a TNF- α , IL-1, IL-18 și IL-33 [11].

Astfel, alterarea pneumocitelor de tip I și edemul alveolar sunt factori care influențează în defavoarea schimbul de oxigen, iar disfuncția pneumocitelor de tip II exacerbează hipoxemia instalată prin colabarea parțială sau totală a alveolelor, cauzată de creșterea tensiunii superficiale în urma periclitării sintezei de surfactant.

Evoluția sustentabilă a inflamației este asigurată de extravazarea celulelor circulante proinflamatoare sub acțiunea chemokinelor (IL-8 demonstrează, de asemenea, efect chemoatractant față de neutrofile) și facilitată de selectine și integrine, expresia cărora este indusă de citokinele proinflamatoare eliberate de pneumocite și macrofage. La pacienții diabetici, expresia selectinelor și integrinelor este a priori majorată, iar producția citokinelor proinflamatoare sub acțiunea CoV-2 este mult mai mare comparativ cu statusul euglicemic, fapt ce explică evoluția agravantă a evenimentelor inflamatorii pulmonare în COVID-19. În plus, diferitele celule pulmonare (pneumocitele de tip I și de tip II, macrofagele alveolare, fibroblastele alveolare și interstițiale) expresează exagerat în diabetul zaharat receptori pentru produsele finale ale glicării, RAGE (*Receptor of Advance Glycation End products*), activarea cărora se impune prin eliberarea de citokine și radicali liberi de oxigen. Expresia RAGE corelează cu gradul de infiltrare a neutrofilelor și severitatea inflamației pulmonare.

Neutrofilele extravazate și monocitele care s-au transformat în macrofage se cantonează în interstițiul pulmonar și chiar în cavitatea alveolară. Citokinele, factorii de creștere și radicalii liberi de oxigen eliberați de aceste celule impun modificări ale spațiului interstițial, iminente inflamației proliferative, datorită activării fibroblastelor și metaloproteinazelor matricei extracelulare, fapt ce rezultă în sinteza excesivă de colagen și acumularea de colagen degradat. Extinderea zonei de fibroză interstițială este în contiguitate cu colapsul alveolar determinat de alterarea pneumocitelor de tip II, afectând ventilația pulmonară și agravând evoluția hipoxemiei. Fibroblastele stimulate de citokine, radicali și factorii de creștere proliferază și eliberează activ citokinele proinflamatoare proprii (în mod deosebit IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α).

Așadar, în epicentrul evenimentelor alveolare se cantonează celulele abile în vederea eliberării de citokine proinflamatoare și factori de stimulare a coloniilor (granulo- și monocitare). Neutrofilia și citokinemia iau proporții mari, iar „furtuna citokinică” devine un factor de instalare a sindromului inflamator cronic ce impune, în primul rând, leziunea multiplă a organelor, primar prin injuria endoteliului vascular (inclusiv bariera hematoencefalică și aparatul glomerular renal), facilitând impactul virusemiei asupra organelor vitale.

corticosteroids [10]. Moreover, the octapeptide is responsible by the triggering dry cough reflex, the afferents of which are intertwined at the level of the upper third of the alveolus.

The extravasation of the liquid facilitated by increased permeability and capillary hydrostatic pressure lead to accumulation of fluid into the pulmonary interstitium (interstitial edema) and subsequent in alveolus (pulmonary or alveolar edema), which represent the cardinal pathogenetic mechanism of acute respiratory distress syndrome. The increased alveolar permeability also can be caused by action of proteases, histamine and leukotrienes (LTC₄) realised by mast cells which express ACE2 and can assure *de novo* synthesis of TNF- α , IL-1, IL-18 and IL-33 [11].

Thereby, injury of type I pneumocytes and alveolar edema are factors that influence detrimental the gas exchange, but dysfunction of type II pneumocytes exacerbates hypoxemia that already is installed, through the partial or total collapse of the alveolus caused by increased surface tension as a result of impairment surfactant synthesis.

The sustainable evolution of inflammation is assured by the extravasation of circulated pro-inflammatory cells under the action of chemokines (IL-8 also demonstrate chemoatractant effect for neutrophils) and is facilitated by selectins and integrins, which expression is induced by pro-inflammatory cytokines realised by pneumocytes and macrophages. In diabetic patients the expression of selectins and integrins are increased, and generation of pro-inflammatory cytokines under the action of CoV-2 is much more than those with euglycemic status, which explain aggravated evolution of pulmonary inflammatory events in COVID-19. Furthermore, different pulmonary cells (pneumocytes type I and type II, alveolar macrophages, alveolar and interstitial fibroblasts) in diabetes mellitus overexpressed receptor of advanced glycation end products (RAGE), activation of that induce realising of cytokines and oxygen reactive species. The expression of RAGE correlates with the degree of neutrophils infiltration and severity of pulmonary inflammation.

The extravasated neutrophils and monocytes that were transformed into macrophages infiltrate the pulmonary interstitium and also alveolar cavity. The cytokines, growth factors and oxygen free radicals realised by these cells lead to changes of interstitial space imminent for proliferative inflammation, due to activation of fibroblasts and extracellular matrix metalloproteinases, resulting in excessive synthesis of collagen and accumulation of deteriorated collagen. The extension of interstitial fibrosis area is in the relationship with alveolar collapse determined by the alteration of type II pneumocytes, disturbance of pulmonary ventilation and aggravation of hypoxemia evolution. The fibroblasts stimulated by cytokines, free radicals and growth factors proliferate and active realise their proper pro-inflammatory cytokines (special IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α).

Therefore, in the epicentre of alveolar events are involved the cells able to realise pro-inflammatory cytokines and colony stimulating factors (granulocyte and monocyte). The neutrophilia and cytokinemia take large proportions, but the „cytokine storm” become a setting factor of chronic inflammatory syndrome which imply first of all, multiple organs injury,

Sistemul imun adaptiv este eșalonul de defensivă principal în confruntarea organismului uman cu CoV-2, realizat prin răspunsul imun celular și umoral. Celulele prezentatoare de antigen profesionale (celulele dendritice și macrofagele) vor prezenta prin intermediul sistemului major de histocompatibilitate 2 antigenul viral determinat de proteina S către limfocitele naive T. Raportul Th1/Th2 va determina caracterul defensivei imune: prin activarea răspunsului inflamator citokinic, cu predominarea Th1 și activarea răspunsului umoral, cu predominarea Th2, dată fiind acțiunea stimulatoră a IL-4, eliberată de Th2, asupra proliferării și diferențierii limfocitelor B în plasmocite și respectiv, sintezei de anticorpi din familia de imunoglobuline G și M. Important de menționat, că sinteza de anticorpi în SARS-CoV-2 durează circa 3 săptămâni, iar în această perioadă persoana poate infecta oricare alte persoane. După restabilirea simptomatică riscul de contaminare se păstrează încă 1-2 săptămâni.

Remarcabil, că la pacienții cu COVID-19 se constată limfocitopenie pe fundalul elevării nivelurilor circulante de neutrofile și citokine proinflamatoare. Mai mult, gradul de limfocitopenie (care nu este, de fapt, caracteristică pentru infecțiile virotice), în primul rând, declinul CD8, se corelează cu severitatea simptomelor COVID-19, iar ameliorarea clinică se decelează în asociere cu creșterea limfocitelor.

Se consideră că una din cauzele principale a limfocitopeniei este determinată de infectarea nemijlocită a limfocitelor cu CoV-2 (acestea expresează receptorul ACE2), fapt ce rezultă în moartea celulară, inclusiv prin apoptoză: limfocitele infectate cu virus expresează receptorul Fas [12]. Expresia crescută a TNF- α reprezintă un factor pro-apoptotic față de limfocite. Există și sugestii, potrivit cărora limfocitopenia ar fi datorată: (1) acțiunii inhibitoare a CoV-2 asupra celulelor de limfopoezie din măduva hematogenă și (2) acțiunii lactoacidozei, determinată de hipoxia tisulară, care are efect supresor asupra proliferării limfocitelor.

Raportul neutrofile / CD8 (N8R) este recunoscut astăzi drept un predictor semnificativ al prognosticului pacienților cu COVID-19 (creșterea lui este un semnal al evoluției precare și al riscului de deces, precum și *vice versa*) [12].

Expresii patologice comune pentru COVID-19 și geneza lor

Febra. Este rezultatul setării punctului termostatic din hipotalamus la un nivel mai ridicat față de cel bazal sub acțiunea prostacilinei (PGI₂). Aceasta din urmă se formează la acțiunea citokinelor proinflamatoare (ex. IL-1, IL-6, TNF- α etc.) care, prin activarea fosfolipazei A₂, segreghează din fosfolipidele acidul arahidonic, sursa PGI₂. Astfel, elevarea temperaturii în infectarea cu CoV-2 începe odată cu creșterea expresiei acestor citokine.

Dispneea, tahicardia și lactoacidoza. Sunt rezultatul hipoxemiei, ce rezultă în activarea centrelor respirator și vasomotor mediate de stimularea chemo-receptorilor centrali. La pacienții cu forme clinice moderate și severe de COVID-19, se anunță niveluri circulante crescute de catecolamine, recunoscute drept furtuna de catecolamine, care asociază și activarea

primary by the vascular endothelial injury (inclusive hematoencephalic barrier and kidney glomerular system), thus facilitating virus impact on the vital organs.

The adaptive immune system is the main defence mechanism in confrontation of human body with CoV-2, realised by the cellular and humoral immune response. The professional antigen presenting cells (dendritic cells and macrophages) via the major histocompatibility complex-2 will present the viral antigen with determinant S protein to naive T lymphocytes. The ratio Th1/Th2 will determine the character of immune defensive: predominance of Th1 will lead to activation of inflammatory cytokine response and predominance of Th2 will lead to activation of humoral immune response, due to stimulatory action of IL-4 on the proliferation and differentiation of B lymphocytes into plasma cells and respectively synthesis of antibodies from immunoglobulin G and M family. It is important to mention that synthesis of antibodies during SARS-CoV-2 lasts about 3 weeks, but during this period the person can infect any other person. After symptomatic recovery the risk of contamination is preserved for another 1-2 weeks.

It is notably, that in patients with COVID-19, have been observed lymphocytopenia on the background of elevated neutrophils and proinflammatory cytokines in the bloodstream. Moreover, the degree of lymphocytopenia (which usually is not characteristic for viral infection) in the first decline of CD8, is correlated with severity of COVID-19 symptoms, but clinical amelioration have been associated with increasing rate of lymphocytes.

It is considered that main cause of lymphocytopenia is determined by direct infection of lymphocytes with CoV-2 (these also express ACE2 receptor) that result in cellular death, inclusive by apoptosis: the virus infected lymphocytes express the Fas receptor [12]. The increased expression of TNF- α represents a pro-apoptotic factor for lymphocytes. It exist suggestions, that lymphocytopenia is due to: (1) inhibitory action of CoV-2 to lymphopoietic cells from the bone marrow and (2) action of lactic acidosis, determined by tissular hypoxia, which has suppressive effect on lymphocytes proliferation.

The ratio neutrophils / CD8 (N8R) it is recognised as a significant predictor of prognosis in patients with COVID-19 (increased level, it is a signal poor control evolution and risk of death) [12].

The pathologic expression common for COVID-19 and their genesis

Fever. It is the result of thermostatic point resetting from hypothalamus at the higher level than of that basal under the action of prostacyclin (PGI₂). This is formed under the action of proinflammatory cytokines (e.g. IL-1, IL-6, TNF- α etc.) which via activation of phospholipase A2 from the membrane phospholipids cleave the arachidonic acid, the main source of PGI₂. Thus, increasing temperature in infection with CoV-2 onset with increasing expression of these cytokines.

Dyspnea, tachycardia and lactic acidosis. They are result of hypoxemia, which activates the respiratory and vasomotor centre mediated by stimulation of central chemoreceptors. In patients with moderate and severe clinical forms of COVID-19,

concludentă a sistemului renin-angiotensin-aldosteron [13]. La această conotație există sugestii privind beneficiul terapeutic al administrării alpha-1-adreno-blocantelor în faza inițială a COVID-19, iar a blocantelor beta-adrenergice – în faza tardivă. Stresul catecolaminic (consecința activării neuronilor paraventriculari ai hipotalamusului la afectarea neuronilor GABA, care expresează ACE2) și factorul inductibil al hipoxiei (HIF-1) vor stimula glicoliza aerobă (i.e. efectul Warburg), având, drept urmare, producția crescută de radicali liberi de oxigen și activarea stresului oxidativ. În consecință, privarea și mai profundă de oxigen va induce lactoacidoză, slab corectată prin ventilație pulmonară. Presupunerea că CoV-2 poate induce hipoxemie hemică prin afectarea capacității hemoglobinei de transport al oxigenului nu a câștigat sufragii la ora actuală. Nu s-au dovedit opiniile anterioare, potrivit cărora CoV-2 pătrunde în eritrocit (care, de altfel, nu expresează ACE2) și decuplează hemul de la schela proteică a hemoglobinei, eliberând fierul bivalent ce se remarcă prin acțiune pro-oxidantă.

Tromboza. Activarea statusului protrombotic și consecințele trombotice iminente (tromboza venelor profunde și tromboflebitele, microangiopatiile trombotice etc.) sunt atestate la pacienții cu COVID-19 la cote de până la 45% [14]. Apanajul fiziopatologic al acestora consemnează mai multe mecanisme patogenetice ale periclitării hemostazei primare și secundare. Micșorarea expresiei ACE2 pe trombocite se soldează cu declinul cantitativ al Ang (1-7), fapt ce rezultă în deprecierea prostaciclinei (factor antiplachetar) și majorarea tromboxanului A2 (factor protrombotic). Leziunile endoteliale se manifestă prin micșorarea trombomodulinei și creșterea factorului von Willebrand, fapt ce accelerează tranziția hemostazei microcirculatorii în coagularea sanguină. Elevarea notabilă (până la 10 g/L) a fibrinogenului (creșterea proteinelor fazei acute a inflamației sub acțiunea IL-1, IL-6 și TNF- α) este un mecanism crucial al coagulopatiei la pacienții cu COVID-19. Totodată, citokinele proinflamatoare exercită efect inhibitor asupra factorilor anticoagulanți (ex. antitrombina, proteinele S și C). De menționat, în acest context, și acțiunea CoV-2 asupra sistemului de fibrinoliză, care se manifestă prin creșterea plasminei datorită creșterii expresiei urokinazei (factorul de activare a plasminogenului). Drept urmare, nivelul D-dimerilor crește considerabil la pacienții cu COVID-19, fenomenul dat influențând benefic prognosticul pacienților care administrează heparină, comparativ cu cei, care nu primesc acest anticoagulant. Astfel, corectarea hemostazei la pacienții infectați cu CoV-2 este o opțiune crucială a strategiei terapeutice. Tratamentul anticoagulant a dovedit pe un lot mare de pacienții cu COVID-19 beneficii la noima prognosticului evoluției clinice și a mortalității.

Concluzii

- 1) Intrarea CoV-2 în celula gazdă este mediată de receptorul membranar ACE2, care după internalizare demonstrează un declin al expresiei. Situațiile patologice care cresc expresia ACE2 argumentează capacitatea de infectare a virusului cu genom ARN și severitatea COVID-19.

is attested high level of circulate catecholamines that associate and activate the renin-angiotensin-aldosterone system [13]. In this context, exist suggestion of given alpha-1-adreno-antagonists in the initial phase of COVID-19, but beta-adrenergic-antagonists – in late phase. The catecholamine stress (the consequence of activation the paraventricular neurons of hypothalamus as response to injury of GABA neurons, expressing ACE2) and hypoxia inductible factor (HIF-1) will stimulate aerobic glycolysis (ie., Warburg effect), subsequent lead to increased production of oxygen free radicals and oxidative stress activation. As a result, severe deprivation of oxygen will lead to lactic acidosis, poor compensated by pulmonary ventilation. The suppositions that CoV-2 can lead to hemic hypoxemia by the affecting carrying oxygen capacity of hemoglobin haven't taken enough votes. It haven't been demonstrated the previous opinions regarding entry of CoV-2 into the erythrocyte (which doesn't express ACE2) and decoupling of haem from the protein complex of hemoglobin, thus realising of di-valent iron with a pro-oxidant action.

Thrombosis. The activation of prothrombotic status and imminent thrombotic events (deep vein thrombosis and thrombophlebitis, thrombotic microangiopathy etc.) are attested at patients with COVID-19 at rate 45% [14]. The pathophysiological prerogative of these events registers several pathogenetic mechanisms of impairment primary and secondary haemostasis. The decreased expression of ACE2 on platelets results in quantitative downregulation of Ang (1-7), that lead to decreasing prostacyclin (anti-platelet factor) and increasing thromboxane A2 (pro-thrombotic factor). The endothelial injuries are manifested by decreasing of thrombomodulin level and increasing von Willebrand factor, fact that accelerates the transition of microcirculatory haemostasis into blood coagulation. The marked elevation (till 10 g/L) of fibrinogen (increased level of acute phase protein of inflammation under the action of IL-1, IL-6 and TNF- α) is one of the crucial mechanisms of coagulopathy in patients with COVID-19. In the same time, proinflammatory cytokines exerts an inhibitory effect on anti-coagulant factors (e.g. antithrombin, protein S and C). In this context, should be mentioned also the action of CoV-2 on fibrinolytic system, characterised by increasing plasmin level due to increased expression of urokinase (activator factor of plasminogen). As a result, the level of D-dimmers is considerably increased in patients with COVID-19, this phenomenon influencing beneficial the prognosis of patients who takes heparin comparing with them that doesn't take this anticoagulant drug. So, managing the haemostasis of COVID-19 patients is a crucial option in therapeutic strategy. The anticoagulant treatment being performed on a large group of COVID-19 patient, has demonstrated benefits regarding the prognosis of clinical evolution and mortality.

Conclusions

- 1) The entry of CoV-2 into the host cell is mediated by the membrane receptor ACE2, which after internalisation demonstrates a decline in expression. The pathologic conditions which increase the ACE2 expression augment

- 2) Afecțiunile respiratorii primare, iminente COVID-19, sunt declanșate de răspunsul imuno-inflamator, jalonat patogenetic în 3 evenimente cheie: producția exagerată de citokine proinflamatoare, care diseminează inflamația prin „furtuna citokinică”, extravazarea lichidului propice dezvoltării edemului alveolar și migrarea neutrofililor și monocitelor circulante ce rezultă în potențarea inflamației și declanșarea creșterii matricei extracelulare prin activarea fibroblastelor interstițiale. Limfocitopenia este un predictor al evoluției precare a COVID-19, estimat, inclusiv, la noima creșterii raportului neutrofile/limfocite.
- 3) Corectarea mecanismelor responsabile de „furtuna citokinică și catecolaminică”, declinul limfocitelor, tromboză, proliferarea pulmonară interstițială, alterarea endotelului vascular și diminuarea Ang (1-7) ar fi o țintă a tratamentului patogenetic al COVID-19.

Contribuția autorilor

Autorii au contribuit în mod egal la căutarea literaturii științifice, selectarea bibliografiei, citirea și analiza referințelor bibliografice, la scrierea manuscrisului și la revizuirea lui colegială. Toți autorii au citit și au aprobat versiunea finală a articolului.

Declarația conflictului de interese

Nimic de declarat.

the infection capacity of virus with RNA genome and severity of COVID-19.

- 2) Primary respiratory disorders mediated by COVID-19 are triggered by the immune-inflammatory response, pathogenetic designed in 3 key events: exaggerated production of proinflammatory cytokines, which disseminate inflammation by “cytokine storm”; the extravasation of fluid characteristic for development of alveolar edema and the migration of neutrophils and circulating monocytes resulting in potentiation of inflammatory process and triggering of extracellular matrix production under the interstitial fibroblasts activation. The lymphocytopenia is a predictor of precarious evolution of COVID-19, estimated inclusive at increasing rate of neutrophils/lymphocytes.
- 3) The correction of responsible mechanisms for “cytokine and catecholamine storm”, lymphocytes decline, thrombosis, interstitial pulmonary proliferation, vascular endothelial alteration and decreased Ang (1-7), will constitute a target point for pathogenetic treatment of COVID-19.

Authors' contributions

The authors contributed equally to the search for scientific literature, the selection of bibliography, the reading and analysis of biographical references as well the writing of the manuscript. All authors have read and approved the final version of the article.

Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

Referințe / references

1. Zheng Y, Ma Y, Zhang J, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature Reviews. Cardiology*, 2020; 17: 259-260.
2. Sun P, Lu X, Xu C. *et al.* Understanding of COVID-19 based on current evidence. *J. Med. Vir.* 2020; <https://doi.org/10.1002/jmv>.
3. Diao B, Wang C, Wang R. *et al.* Human kidney is a target for novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. *Med. Rxiv.* 2020; doi: 10.1101/2020.03.04.20031120.
4. Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Intern. Med.*, 2020. doi: 10.1016/j.ejim.2020.04.037.
5. Xu H, Zhong L, Deng J. *et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*, 2020; 12 (8): 79-83.
6. Gurwitz D. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. *Drug Dev. Res.*, 2020. doi:10.1002/ddr.21656.
7. Bernstein K, Khan Z, Giani J. *et al.* Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2018; 14: 325-336.
8. Kumar S, Nyodu R, Maurya V, Saxena S. Morphology, genome organization, replication, and pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In: Saxena S. (eds.) Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), 2020; Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control. *Springer*, Singapore, p. 23-31.
9. Zeigler C., Allon S., Nyquist S. *et al.* Interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell*, 2020. doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035.
10. van de Veerdonk F, Netea M., van Deuren M. *et al.* Kinins and cytokines in COVID-19: a comprehensive pathophysiological approach. *Preprints Hypothesis, Version-1.* 2020; 2020040023 (doi:10.20944/preprints202004.0023.v1).
11. Kritas S., Ronconi G., Caraffa A. *et al.* Mast cells contribute to coronavirus induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 2020; 34 (1). doi: 10.23812/20.
12. Tan L., Wang Q., Zhang D. *et al.* Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2020; 5 (33). doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4.
13. Steenblock C., Todorov V., Kanczkowski W. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the neuroendocrine stress axis. *Mol. Psychiatry*, 2020; doi.org/10.1038/s41380-020-0758-9.
14. Klok F, Kruip M., van der Meer N. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: an updated analysis. *Thrombosis Research*, 2020. doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.041.