

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

НАЗИВ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПРИЈЕМА		26.06.2025	
Орг. јед.		Број	Лист
05	4818		

ОЦЕНА МЕНТОРА О ИЗВЕШТАЈУ О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ ОДНОСНО ДОКТОРСКОГ УМЕТНИЧКОГ ПРОЈЕКТА

НАЗИВ ДИСЕРТАЦИЈЕ	Постпартално испитивање утицаја COVID-19 на постелично ткиво пацијенткиња инфицираних током трудноће		
Кандидат	Марија Бићанин Илић		
Ментор	Проф. др. Александра Димитријевић		
Датум пријема потпуног извештаја о провери оригиналности докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта	24.06.2025.		

Овим потврђујем да је наведена докторска дисертација оригинална, тј. да представља резултат оригиналног рада докторанда. Такође потврђујем да су току рада поштована академска правила цитирања, навођења извора и сл. Подударање текста ове дисертације са другим изворима чини свега 7% укупно. Подударања текста која нису последица цитата, личних имена и библиографских података о коришћеној литератури, односи се на примену исте или сличне методологије односно упитника коришћених приликом прикупљања података у оквиру ове докторске дисертације.

Овај извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те прописани поступак припреме за одбрану може наставити.

Датум

26.06.2025.

ПОТПИС МЕНТОРА

ПОСТПАРТАЛНО ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА COVID-19 НА ПОСТЕЉИЧНО ТКИВО ПАЦИЈЕНТКИЊА ИНФИЦИРАНИХ ТОКОМ ТРУДНОЋЕ

By Марија Бићанин Илић



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марија В. Бићанин Илић

**ПОСТПАРТАЛНО ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА
COVID-19 НА ПОСТЕЉИЧНО ТКИВО
ПАЦИЈЕНТКИЊА ИНФИЦИРАНИХ ТОКОМ
ТРУДНОЋЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2025.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Marija V. Bićanin Ilić

**POSTPARTALNO ISPITIVANJE UTICAJA
COVID-19 NA POSTELJičNO TKIVO
PACIJENTKINJA INFICIRANIH TOKOM
TRUDNOĆE**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2025.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Marija V. Bicanin Ilic

**POSTPARTUM INVESTIGATION OF THE
INFLUENCE OF COVID-19 ON THE PLACENTAL
TISSUE OF FEMALE PATIENTS INFECTED
DURING PREGNANCY**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025.

Идентификациона страница докторске дисертације (ћирилицом)

Аутор
Име и презиме: Марија Бићанин Илић
Датум и место рођења: 19.03.1981.г Прокупље
Садашње запослење: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу Клиника за Гинекологију и акушерство УКЦ Крагујевац
Докторска дисертација
Наслов: „Постпартално испитивање утицаја COVID-19 на постелјично ткиво пацијенткиња инфицираних током трудноће “
Број страница: 96
Број слика: 7 слика, 1 шема, 19 табела, 30 графика
Број библиографских података: 217
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета проф. др Александра Димитријевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-03-8/11 од 22.01.2025.

Identifikaciona stanica doktorske disertacije (latinica)

Autor
Ime i prezime: Marija Bićanin Ilić
Datum i mesto rođenja: 19.03.1981. Prokuplje
Sadašnje zaposlenje: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, UKC Kragujevac
Doktorska disertacija
Naslov: „Postpartalno ispitivanje uticaja COVID-19 na posteljичno tkivo pacijentkinja inficiranih tokom trudnoće “
Broj stranica: 96
Broj slika: 7 slika, 1 šema, 19 tabela, 30 grafika
Broj bibliografski podataka: 217
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke
Mentor: titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/instituta i univerziteta: Prof. dr Aleksandra Dimitrijević, redovni profesor Fakulteta Medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije: IV-03-8/11 od 22.01.2025.

Identifikaciona stranica doktorske disertacije na engleskom jeziku

Author
Name and surname: Marija Bicanin Ilic
Date and place of birth: 19.03.1981. Prokuplje
Current employment: Faculty of Medical Science, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: „Postpartum study of COVID-19 effect on placental tissue in patients infected during pregnancy “
No. of pages: 96
No. of images: 7 images, 1 scheme, 19 tables, 30 charts
No. of bibliographic data: 217
Institution and place of work: University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences
Scientific area (UDK): Medical sciences
Mentor: title, name and surname, position, name of faculty/institute and university Prof. dr Aleksandra Dimitrijevic, Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-8/11 from 22.01.2025.

ЗАХВАЛНИЦА

Захваљујем се најпре свом ментору, Проф. др Александри Димиријевић на несебичној професионалној, моралној и логистичкој подршци од самог настанка идеје до коначне реализације, током свих фаза израде ове дисертације. Хвала на саветима и искуству које је пренела на мене, а који су допринели успешном завршетку овог дугог и изазовног пута.

Захваљујем се својим колегама гинекологима као и сестрама и бабицама ГАКа УКЦ Крагујевац који су несебично пружали подршку у прикупљању узорака за време немогућих услова рада који су нас затекли током пандемије COVIDa-19.

Велику захвалност дугујем катедри за Физиологију и катедри за Фармацију на предивној оствареној сарадњи током обраде лабораторијских узорака, а посебну захвалност бих изразила Проф. др Тамари Николић Турнић на саветима и подршци током читавог истраживања и публиковања резултата студије.

Посебну захвалност бих дугујем члановима своје породице, својим синовима Димитрију и Михајлу и супругу Игору, који су заједно са мном прошли кроз све изазове и искушења које носи процес стварања докроске дисертације. Хвала на стрпљењу, разумевању и подршци коју сте ми пружали, а Димитрију додатно хвала и на саветима у вези поступака израде научно-истраживачког рада.

Овај докторат посвећујем својој куми **Јелени (Милошевић) Булатовић**, која ми је била узор у људскости, преданости и посвећености.

Идеја за ово истраживање потекла је од ње.

Иако, на жалост више није са нама, у мом срцу живеће заувек.

Знам да би била срећна и поносна.

Један живот је кратак оквир за велика пријатељства.

Марија Бићанин Илић
Крагујевац, 2025.

САЖЕТАК

Увод: Испитивање патолошких промена постеличног ткива пружа нам прилику да разоткријемо механизме којима вирус утиче на трудноћу и плод. Утицај вирусне инфекције на плод може бити директан, трансмисијом кроз постелицу и индиректан-стварањем неповољних услова за развој плода као последице инфламације, микротромбоза и хиперкоагулације.

Циљ рада је испитивање утицаја SARS-COV-2 на настанак патолошких промена у ткиву постелице пацијенткиња инфицираних током трудноће, на настанак оксидативног стреса мајки и новорођенчета као и испитивање могућности директне трансмисије са мајке на плод.

Материјал и методе: Спроведена је опсервациона клиничка студија која има у фокусу труднице инфициране SARS-COV-2 вирусом током трудноће. Вршено је хистопатолошко и имунохистохемијско испитивање постеличног ткива, испитивање биомаркера оксидативног стреса мајке и новорођенчета и серолошко испитивање присуства IgM Ат на SARS-COV-2 антиген код новорођенчади.

Резултати: FVM су значајно учесталије плацентне лезије код трудница инфицираним SARS-COV-2 током трудноће. TBARS је био значајно повишен у серуму мајки и новорођенчади SARS-COV-2+ групе. SARS-COV-2 IgM антитела у крви новорођенчади у првом дану била су значајно повишена у групи инфицираних мајки у односу на контролну групу. Уочена је значајно израженија имунореактивност на Spike протеин и CD68+ леукоците у ткиву постелица инфицираних трудница у односу на контролну групу.

Закључак: Плацентне патолошке лезије су изражене код трудница инфицираних SARS-COV-2 у трудноћи. Директна трасмисија са мајке на плод је могућа. T-BARS има значај као потенцијални биомаркер оксидативног стреса насталог као последица SARS-COV-2 инфекције у трудноћи и оштећења плацентног ткива.

Кључне речи: оксидативни стрес у трудноћи, SARS-COV-2 трудноће, патолошке плацентне лезије

Introduction: Examination of pathological changes in placental tissue provides us with the opportunity to unravel the mechanisms by which the virus affects pregnancy and the fetus. The impact of viral infection on the fetus can be direct, by transmission through the placenta, and indirectly, creating unfavorable conditions for the development of the fetus because of inflammation, microthrombosis, and hypercoagulation

This study aims to investigate the impact of SARS-CoV-2 on the occurrence of pathological changes in the tissue of the placenta of patients infected during pregnancy, on the occurrence of oxidative stress in mothers and newborns, as well as on the possibility of direct transmission from mother to fetus.

Material and methods: An observational clinical study was conducted focusing on pregnant women infected with SARS-COV-2 virus during pregnancy. Histopathological and immunohistochemical examination of placental tissue, examination of biomarkers of oxidative stress of mother and newborn and serological examination of the presence of IgM At on SARS-COV-2 antigen in newborns were performed.

Results: FVMs are significantly more common placental lesions in pregnant women infected with SARS-CoV-2 during pregnancy. TBARS was significantly elevated in the serum of the mothers and newborns of the SARS-COV-2+ group. SARS-COV-2 IgM antibodies in the blood of newborns on the first day were significantly elevated in the group of infected mothers compared to the control group. Significantly more pronounced immunoreactivity to Spike protein and CD68+ was observed in the placental tissue of infected pregnant women compared to the control group.

Conclusion: Placental pathological lesions are expressed in pregnant women infected with SARS-COV-2 in pregnancy. Direct transmission from mother to fetus is possible. T-BARS has significance as a potential biomarker of oxidative stress resulting from SARS-COV-2 infection in pregnancy and damage to placental tissue.

Key words: oxidative stress in pregnancy, SARS-COV-2 pregnancy, pathological placental lesions

Садржај

1. УВОД	1
1.1 COVID-19	1
1.1.1 Епидемиологија.....	1
1.1.2 Етио-патогенеза COVID-19.....	1
1.1.3. Клиничка презентација COVID-19	3
1.1.4. Физиолошке промене у трудноћи.....	3
1.1.5. Патофизиологија COVID-19 у трудноћи	4
Повезаност хистопатолошких промена постелица са исходом трудноће	10
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ РАДА.....	12
2.1 Главни циљ истраживања	12
2.2 Специфични циљеви	12
2.3 Хипотезе рада.....	13
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	14
3.1 Врста студије.....	14
3.2 Место обављања истраживања.....	14
3.3 Популација која се испитује	14
3.3.1. Испитаници.....	15
3.4 Врста биолошког материјала.....	16
3.4.1. Узorkовање биолошког материјала	16
3.4.2. Достављање и чување биолошког материјала	17
3.5. Варијабле које се мере у студији	17
3.5.1. Независне варијабле:	17
3.5.2. Зависне варијабле:	18
3.6. Снага студије и величина узорка	25
3.7. Статистичка обрада података	25
4. РЕЗУЛТАТИ.....	26
4.1 Клиничке карактеристике пацијенткиња оболелих од COVID-19 у односу на контролну групу	26
4.2 Перинаталне карактеристике новорођенчади мајки инфицираних SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу	29
4.3. Анализа нивоа оксидативног стреса према присуству инфекције SARS-COV-2 мајке	35
4.3.1. Анализа нивоа биомаркера оксидативног стреса унутар SARS-COV-2+ групе пацијенткиња према триместру у коме се одиграла инфекција.....	39

4.3.2. Анализа нивоа биомаркера оксидативног стреса унутар SARS-COV-2+ групе пацијенткиња према тежини клиничке слике мајке	40
4.4. Заступљеност хистопатолошких лезија у плаценти у вези са присуством инфекције SARS-COV-2 мајке	41
4.4.1. Заступљеност хистопатолошких лезија у плаценти унутар SARS-COV-2 групе трудница у односу на триместар у коме се догодила инфекција	46
4.4.2. Заступљеност хистопатолошких лезија у плаценти унутар SARS-COV-2+ групе трудница у односу на тежину клиничке слике мајке	46
4.5. Имунохистохенијска анализа	48
4.5.1. Анализа експресије ACE2 рецептора унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу	48
4.5.2. Експресије SPIKE протеина унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу	49
4.5.3. Експресија CD 68+ леукоцита унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу	51
4.6. Детекција IgM антитела у крви новорођенчади на SARS-COV-2 вирус ELISA методом	55
4.7. Испитивање повезаности перинаталног исхода са тренутком обољевања	56
4.8. Испитивање повезаности експресије SPIKE протеина у ткиву постелице заражених пацијенткиња са нивоом биомаркера оксидативног стреса мајке и плода	57
4.9. Испитивање повезаности експресије SPIKE протеина са перинаталним исходом	58
4.10. Испитивање повезаности експресије SPIKE протеина унутар постеличног ткива пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 са експресијом CD68+ макрофага и експресијом ACE2 рецептора унутар постеличног ткива	59
4.11. Испитивање повезаности експресије ACE2 рецептора унутар постеличног ткива са биомаркерима оксидативног стреса мајке и новорођенчета	59
4.12. Испитивање повезаности експресије CD68 макрофага у ткиву постелице са биомаркерима оксидативног стреса мајке и новорођенчади	60
4.13. Испитивање повезаности нивоа IgM SARS-COV-2 At у крви новорођенчета са нивоом биомаркера оксидативног стреса код мајке и новорођенчета	60
4.14. Испитивање повезаности патохистолошких налаза у ткиву постелице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 са нивоом биомаркера оксидативног стреса мајке и плода	61
5. ДИСКУСИЈА	64
5.1. Демографски подаци и клиничке карактеристике трудница оболелих од COVIDa-19 током трудноће	64
5.2. Демографски подаци и клиничке карактеристике новорођенчади мајки оболелих од COVID-19 током трудноће	64

5.3. Трансплацентна трансмисија SARS-COV-2 вируса на плод.....	65
5.4. Поређење параметара оксидационог стреса и антиоксидационе заштите мајки и новорођенчади из трудноћа оптерећених SARS-COV-2 инфекцијом и контролне групе.....	66
5.5. Анализа морфолошких хистопатолошких промена унутар ткива постељице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће	68
5.6. Анализа експресије ACE2 рецептора у ткиву постељице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће.....	70
5.7. Анализа експресије Spike (S) протеина у ткиву постељице пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу	71
5.8. Анализа експресије CD68 макрофага унутар постелјичног ткива пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће.....	73
5.9. Параметри ОС трудница оболелих од COVID 19 у односу на налаз хистопатолошких промена постелјичиног ткива	73
5.10 Корелација позитивног налаза IgM антитела на SARS-COV2 код новорођенчади са биомаркерима оксидативног стреса мајке.....	74
6. ЗАКЉУЧЦИ	75
6.1. Примарни закључци	75
6.2. Секиндрни закључци	76
7. ЛИТЕРАТУРА.....	78
СКРАЋЕНИЦЕ.....	95
Биографија	97

1. УВОД

1.1 COVID-19

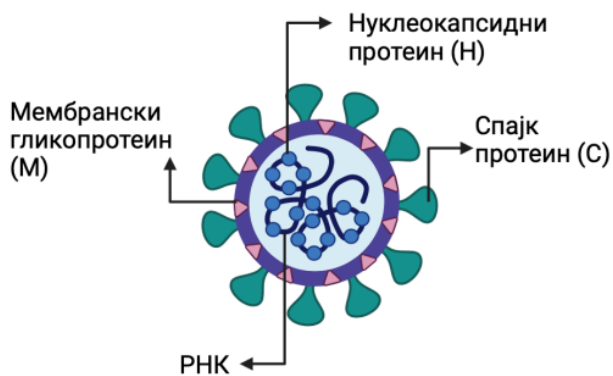
1.1.1 Епидемиологија

Први случајеви обољевања од тешког акутног респираторног синдрома (Severe Acute Respiratory Syndrome) забележени су у Вухану (Кина) у децембру 2019. (1,2) COVID-19, изазван вирусом SARS-COV-2, брзо се проширио широм света, па је Светска Здравствена Организација 11. марта 2020. прогласила глобалну пандемију. (3)

За кратко време, болест је постала водећи светски проблем економског и здравственог система због брзине ширења пандемије и непредвидивог тока. Пажња целокупне научне јавности постала је заокупљена проучавањем патофизиолошких механизма болести, идентификацијом фактора ризика, превенцијом настанка компликација и изналажењем терапијских модалитета у лечењу болести. Подаци СЗО говоре да број пацијената оболелих од COVID-19 од почетка пандемије до августа 2024. г. премашује 776 милиона са преко 6.95 милиона смртних случајева (4,5). Упоредо са брзим ширењем вирус је и еволуирао те су настали сојеви Alpha, Beta, Gamma, Delta и Omicron варијанте што је омогућило још виши степен вируленце и реинфекцију. (4) И након проглашења краја пандемије 11. маја 2023. од стране СЗО, COVID-19 остаје један од највећих изазова с којим се здравствени систем суочава јер нема области на коју болест није оставила девастирајуће последице, укључујући ментално здравље, економски интегритет, моралитет од других болести због недоступности здравствене заштите као и повећан број суицида и самоповређивања. (6–8)

1.1.2 Етио-патогенеза COVID-19

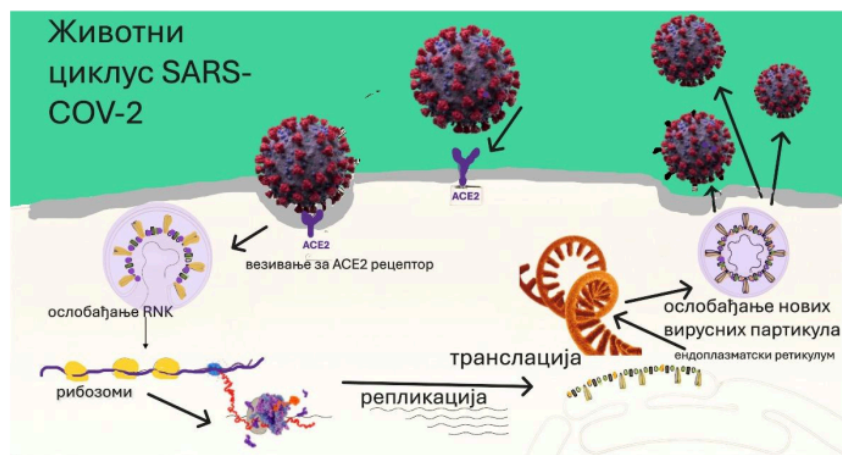
SARS COV-2, припадник групе бета типа Coronaviridae је патоген одговоран за настанак COVID-19. (9,10) По структури је РНК вирус са омотачем који дели генетску секвенцу са појединим SARS вирусима идентификованих код слепих мишева и панголина што указује на његово зоогено порекло. (11) Поред вирусне РНК у грађи вируса учествују и четири структурна протеина: spike (S) протеин, nucleocapsid (N) протеин, envelope (E) протеин и membrane (M) протеин а сваки од њих има специфичну улогу у патогенези. (12)



Слика 1: Структура SARS-COV-2

SARS-COV-2 се преноси са заражених особа или асимптоматских носилаца путем капљичне инфекције или преко додира контаминираних површина. (4,10) Када вирус доспе у контакт са потенцијалним домаћином најпре се помоћу протеина S везује за ACE2 рецепторе те долази до фузија мембрана вируса и ћелија. (13–15) Ови рецептори се налазе на ћелијама бубрега, ендотела, срца, макрофагима и пнеумоцитима али преобладајући су на алвеоларним епителним ћелијама типа 2 што их чини високо осетљивим на дејство вируса. (16–18)

Кључну улогу поред ACE2 рецептора има и Type 2 Transmembrane Serine Protease (TMPRSS2). Ова протеаза доводи до цепања и промене облика протеина S која олакшава фузију мембрана вируса и домаћина и омогућава да RNK вируса продре у ћелију домаћина и започне репликацију. (4)



Слика 2: Животни циклус SARS-COV-2

RNK вируса служи као матрица за умножавање вирусне RNK и протеина који се даље ослобађају заражавајући нове ћелије. Ослобађање вируса у крвоток доводи до запаљенске реакције посредоване ослобађањем цитокина и последичном активацијом система коагулације. (16,19) Активација моноцита у оквиру одговора акутне фазе доводи до оштећења ендотела које је кључно за активирање прокоагулантног система унутар организма и настанак имунотробозе. Поред овог механизма за настанак компликација код пацијената оболелих од COVID-19 заслужан је и интрахоспитални венски тромбоемболизам. (16,20–24) ВТЕ настаје као последица активације Виркоховог тијаса: активације ендотела, протромботичног стања и смањене покретљивости пацијената.

Обзиром да је преобладајући пут ширења инфекције капљични, након контакта са ћелијама носне слузокоже, уколико не дође до ерадикације вируса настају симптоми порекла горњег респираторног тракта: ринореја, кијавица, кашаљ, малаксалост и грозница. Код пацијената који чији организам је способан да развије адекватан имуни одговор модулисан цитокинима и антивирусним интерферонима, репликација вируса се зауставља и болест је ограничена у овом стадијуму. (25–27) Уколико не дође до правовремене елиминације вируса имуни одговор се одвија по типу неспецифичне имуне реакције која настаје након оштећења ћелија домаћина. Долази до пироллизе, апоптозе и некрозе ћелија која још више погодује даљем оштећењу ткива и активацији ткивног

фактора на ћелијама макрофага, ендотела и неутрофила што погодује активацији система коагулације у плућима те на тај начин настају микротромби и акутни респираторни дистрес. (4)

1.1.3. Клиничка презентација COVID-19

Прва фаза инфекције је обично асимптоматска, међутим пацијент поседује вирулентност која достиже врхунац са појавом симптома и може се одржавати и након реституције те је пропација вируса тиме олакшана. (4,28,29) Уколико не дође до ерадикације вируса у раној фази, инфекција се шири на ћелије доњег респираторног тракта те настају карактеристични симптоми: диспноја, кашаљ, продукција спутума као последица деструкције пнеумоцита и стварања хијалиних мембрана. Код једне петине пацијената долази до појаве озбиљних симптома који карактеришу ARDS, DIK и плућни емболизам. (30) На основу тежине симптома, ток COVID-19 може бити асимптоматски, благ, умерен, тежак и критичан. (31) На тежину клиничке слике утичу и оптерећење вирусом, инфламација и стање имуног система. (4) Фактори као што су: старост, пол, придружене болести и гојазност, повезани су са тежином болести и повећаном смртношћу. (32) На основу клиничких искустава и закључака студија **6** проведених током претходних епидемија изазваних корона вирусима као што су: **Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle Eastern Respiratory Syndrome (MERS)**, пацијенткиње заражене током трудноће сврстане су у групу пацијената са повишеним ризиком за развој тежих облика болести и смртности. (6,33,34) Неколико студија спроведених у Француској и Британији идентификовало је факторе ризика који сврставају труднице у групу пацијената са веома повишеним ризиком, а то су BMI>35, хипертензија, гестацијски дијабетес, болести штитасте жлезде. (35)

1.1.4. Физиолошке промене у трудноћи

Физиолошке промене које прате трудноћу теоретски би могле допринети развоју тежих форми COVID-19 у овој групи пацијенткиња. Пре свега у трудноћи долази до елевације дијафрагме и измењене механичке функције плућа што би могло додатно компромитовати вентилацију оболелих пацијенткиња. Уз то још на самом почетку трудноће долази до повећања волумена плазме и последичне пропустљивости капилара што представља додатни ризик за развој озбиљних плућних компликација. (36) Под утицајем прогестерона долази до отока слузокоже горњег респираторног тракта што погодује адхеренцији вируса и уз повећан број респирација које су такође карактеристичне у трудноћи доводи до повећане могућности адхеренције вируса инхалацијом. (37) Подаци Америчког центра за контролу болести и превенцију показују да труднице имају исти ризик од смртог исхода али повећан ризик од настанка компликација које захтевају хоспитализацију и пријем у ЈИЛ у односу на пацијенткиње које нису трудне. (16)

Имуни систем у трудноћи се мења упоредо са развојем фетуса како би обезбедио неопходну имунотолеранцију али и адекватну заштиту организма. Те промене су динамичне и прате гестацијску старост како би омогућиле несметан развој плода те у првом триместру доминирају про-инфламаторни механизми, други триместар карактеришу антиинфламаторни а у трећем превагу поново преузимају про-инфламаторни механизми. (38) Током трудноће смањује се Th1 индукован имуни одговор у корист Th2 одговора што води ка повећаној продукцији анти-инфламаторних цитокина (IL4, IL10). Активација имуног одговора и интерлеукинима инициране цитокинске олује кључан су фактор за настанак тешких форми болести, те се претпоставља да су пацијенткиње инфициране у првом и трећем триместру у већем ризику за настанак озбиљних компликација. (39,40)

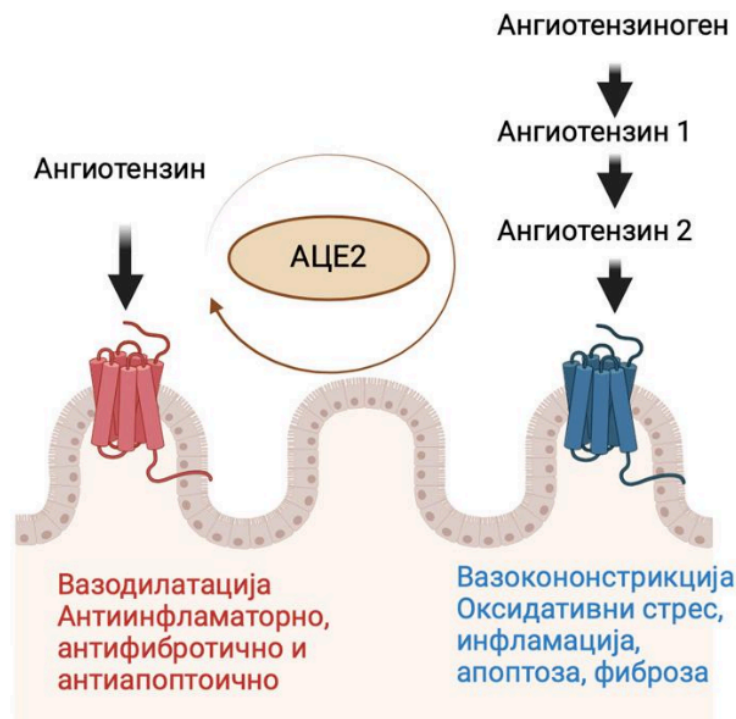
Трудноћа представља хиперкоагубилно стање које карактерише повишен ниво про-тромботичких фактора као што су фактори VII, VIII, X, XII, von Willebrand фактор и фибриноген као и снижен протеин S и измењена фибринолиза посебно у перипарталном периоду. (16,41) Обзиром да је на основу ових физиолошких промена код трудница учествовао ризик од настанка венских тромбоемболијских компликација у односу на општу популацију SARS-COV-2 инфекција може довести до озбиљних тромбоемболијских компликација. (42,43)

ACE2 рецептор који је кључан за регулацију крвног притиска, такође подлеже променама у трудноћи. Бројне студије показале су повећану експресију ACE2 током трудноће, посебно код пацијенткиња које конзумирају дуван, што утиче на повећану осетљивост трудница на SARS-COV-2 инфекцију. Повећан број ACE2 рецептора детектује се у ткиву бубрега, постељице и материце. (44–47)

1.1.5. Патофизиологија COVID-19 у трудноћи

COVID-19 и након опсежних мера спроведених на сузбијању болести, укључујући и имунизацију, представља претњу и оптерећење за здравствени систем, а посебно за вулнерабилне подгрупе популације у које се убрајају и труднице, те је неопходно разумети патофизиолошки механизам обољевања током трудноће. Спроведена су бројна истраживања која се баве утицајем SARS-COV-2 инфекције на установљене физиолошке матерналне, фето-плацентарне и неонаталне механизме. (48)

Ензимска активност ACE2 рецептора у трудноћи је повећана како би путем регулаторног механизма ренин-ангиотензин алдостерон била обезбеђена адекватна циркулација постељице, смањивањем периферног крвног притиска конверзијом ангиотензина I и II у ангиотензин (1-7) и ангиотензин (1-9). (49–53) Поједине студије показују динамичке промене у коекспресији овог рецептора кроз гестацију на ћелијама постељице и фетуса чинећи их подложним за инвазију SARS-COV-2 вируса, но обзиром да је за директну трансмисију поред ACE2 рецептора неопходно и присуство и корегулација и трансмембранске серин протеазе 2 (TMPRSS2), вертикална трансмисија на плод је и даље тема истраживања. (54–56) Обзиром да овај рецептор представља и улазно место SARS-COV-2 вируса у ћелију, везивање вируса доводи до конкуритивне инхибиције рецептора која је одговорна за вазодилатацију и активацију система комплемената који воде ка ендотелној дисфункцији и настанку микротромбоза у овом протромботичком окружењу. (53,57–59) Но, ACE2 није само рецептор већ је одговоран и за продукцију цитокина, имуни одговор и репликацију вирусног генома (44) ACE2 је инволвиран у регулацију два важна хормонална система RAS (Renin-angiotenzin) и Kalikrein-kinin (KKS) током трудноће, те је смањена функција ACE2 рецептора повезана са настанком прееклампсије и интутериног застоја у расту плода услед неадекватне плацентације и хемодинамске адаптације на трудноћу. (53,60–62)



Слика 3: Улога ACE2 рецептора у патогенези COVID-19

Директна цитотоксичност вируса као и повреде ендотела доводе до инфламаторних промена у сложеном функционисању имунолошког система труднице који се мења у складу са потребама растућег заетка, те тако време заражавања у трудноћи може бити од великог значаја за прогнозу тока болести, матерналног имуног одговора, ослобађања од вируса и перинаталног исхода. (58) Студије које су се бавиле истраживањем целуларног и хуморалног имуног одговора као и медијатора инфламације у периферној крви трудница и у умбиликалним крвним судовима новорођенчета показале су да су труднице подложније цитокинској олуји током SARS-COV-2 инфекције, посебно током првог и трећег триместра које карактерише проинфламаторно окружење. (48,63–67)

Утицај вирусне инфекције на плод може бити директан, трансмисијом кроз постељицу и индиректан-стварањем неповољних услова за развој плода као последице инфламације, микротромбоза и хиперкоагулације.

1.1.5.1 Пuteви трансмисије SARS-COV-2 на плод

Три су начина трансмисије вируса на плод/новорођенче:

- Директна/интраутерина трансмисија,
- интрапартална и
- постпартална трансмисија.

Директна трансмисија на плод је фокус научних истраживања због потенцијалних перинаталних, неонаталних и одложених компликација. Првобитне студије које су се бавиле директном трансмисијом показале су да није било убедљивих доказа о овом начину заражавања, међутим како је епидемија прерастала у светску

пандемију мета анализе су показале да је око 8.8% новорођенчади COVID-19 позитивних мајки на рођењу имало позитиван SARS-COV-2 PCR или серолошки тест добијен након узимања назофарингеалног бриса. (53,68)

Метода одређивања директне трансмисије на плод такође је предмет научних недоумица, јер код одраслих респираторни тракт је као примарно место инфекције и највеће концентрације вируса те се врши анализа узорака путем назофарингеалног или орофарингеалног бриса, док код новорођенчета поред овог начина предложено је и серолошко одређивање концентрације специфичних IgM антитела на SARS-COV-2 обзиром на непознато место примоинфекције. (69,70)

IgM антитела као део имуног одговора на специфичну вирусну инфекцију, за разлику од IgG антитела немају способност проласка кроз плацентну баријеру те могу бити корисна у одређивању потенцијалне директне трансмисије на плод. Слаба страна ове методе је постојање укрштене реакције и лажно позитивног резултата те PCR тест назофарингеалне/орофарингеалне слузнице представља златни стандард за одређивање присуства SARS-COV-2 инфекције код новорођенчета. (3) Студије које су се бавиле испитивањем директне трансмисије користиле су још као методу RNA Scope i In situ хибридизацију у ћелијама синциотиотрофобласта, међутим главни проблем интерпретације је недоследност резултата доступних тестова. Сензитивност RT-PCR теста је највиша из узорка бронхијалног лавата (93%), а знатно нижа из назофарингеалног бриса и фецеса (63% и 29%), но као инвазивна метода није погодна за тестирање новорођенчади (71)

1.1.5.2. Оксидативни стрес у трудноћи

Оксидативни стрес је један од кључних чинилаца у патогенези COVID-19 инфекције. (72–74) Оксидативни стрес представља нарушену хомеостазу у организму између оксиданаса и антиоксиданаса која води ка даљем поремећају редоксног система и оштећењу молекула. Слободни радикали су веома реактивни молекули са вишком једног или више електрона који лако ступају у интеракцију са другим молекулима и доводе до поремећаја у физиолошки подешеном систему здравог организма. Прекомерна продукција слободних радикала: реактивне кисеоничне врсте (ROS), реактивне азотне врсте (RNS) и реактивне хлорне врсте (CRS) доводи до директне пероксидације мембрана, структурних протеина, ензима и нуклеинских киселина, а може се у физиолошким условима неутралисати интеракцијом са ензимским и неензимским антиоксидансима. Уз ендogene (ензимске и неензимске антиоксидансе) постоји и група екзогенних (природних или синтетских антиоксиданаса) који такође имају улогу у везивању неупарених електрона слободних радикала и њиховом стабилизовању те се њихово кумулативно дејство дефинише као тотални антиоксидативни капацитет (TAC). (75–78)

Током научних покушаја да се у организму установи ниво оксидативног стреса настао је читав панел биохемијских маркера ОС који су на основу свог порекла подељени на:

1. молекуле који настају услед интеракције са слободним радикалима:

- Производе липидне пероксидације: (малониладехид, акролеин, изопростани),
- Производе оксидације протеина: (протеин карбонил, тирозинска група),
- Производе ДНК оксидације (8-хидрокси-2-деоксигуанозин),
- Протеинне стрес реакције, нове биомаркере (микроRNA)

2. Молекуле који припадају систему антиоксидативне заштите као што су

- ензими (мијелопероксидаза),
- тиоли (глутатион)
- циркулишући антиоксиданси (CAT, GPX, SOD) (77,79–81).

1.1.5.2.1. Улога оксидативног стреса/антиоксидативне заштите у настанку хистопатолошких промена постељице

Плацентна исхемија која може настати као директна последица SARS-COV-2 инфекције, или системске хипоксије и инфламације, доводи до поремећаја баланса ROS и антиоксидативне заштите и води ка настанку оксидативног стреса. ОС је одговоран за оштећења протеина, липида и ДНК. Плацента поседује сопствене механизме којима се супроставља побуђеном оксидативном стресу како би умањила оштећење ткива а то су продукција NO, потентног вазодилататора и антиоксиданса. (82) Уз NO значајну гасотрансмиторну и вазодилаторну улогу имају и CO и H₂S. (83)

Развој постељице започиње имплантацијом оплођене бластоцисте и примаран начин транспорта кроз постељицу је дифузија. Крвни судови примарних вилуса су оклудирани су што доводи до стварање услова ниског парцијалног притиска O₂ који је неопходан за нормалан раст и развој ембриона и спречавање стварања ROS. (84) Како трудноћа напредује, од периферије постељице ка средишту постепено долази до отварања оклудираних крвних судова и постепеног повећања парцијалног притиска кисеоника унутар интервилозног простора захваљујући континуираном протоку оксигенисане крви. Овај процес одвија се крајем првог триместра и одговоран је за помак у парцијалном притиску кисеоника у интервилозном простору. (85) Када дође до поремећаја на било ком нивоу плацентације резултат је нагли пораст притиска кисеоника унутар интервилозног простора и последично настајање ROS. (86) Постепени пораст притиска O₂ оумгућава да се постељица адаптира на новонастале услове стварања ROS развојем система антиоксидативне заштите (у првом реду продукцијом GPx и CAT). (87) Како би се опонирало дејство ROS (O₂^{•-}, NO, H₂O₂, ONOO⁻) у ћелијама цитотрофобласта и строме развија се систем заштите који обухвата ензиме MnSOD, CuSOD, ZnSOD, међутим када ниво продукције ROS превазиђе антиоксидативни капацитет постељице настају оштећења протеина, липида и ДНК те оштећење и смрт ћелија. (87,88)

Проучавајући утицај оксидативног стреса на постелично ткиво у односу на старост трудноће научници су показали да у првом триместру доминирају промене унутар синциотиотрофобласта у односу на цитотрофобласт које се огледају у смањењу површине микровилуса и смањењу митохондрија са детектованом веома ниском количином антиоксиданса. (89) Фактор заслужан за настанак оксидативног стреса током другог и трећег триместра је интермитентан проток мајчине крви унутар вилуса који производи исхемијско-реперфузионо оштећење. (90)

1.1.5.2.2. Биомаркери оксидативног стреса у трудноћи

Водећи се патофизиолошким механизмима одговорним за настанак патохистолошких промена у зависности од оксидативног стреса научници су истраживали молекуле који би потенцијално могли предвидети ниво оштећења ткива и исход трудноће. Међу испитиваним биомаркерима највећи значај имају MDA и TBARS као производи липидне пероксидације, циркулишућа фетална mRNK, гасотрансмитери (NO, CO, H₂S). (82) За продукцију NO одговорна је NOS (NO синтетаза) која потиче из феталног синциотиотрофобласта, ендотела и екстравилозног трофобласта. (82)

Одређивање појединачних биомаркера оксидативног стреса у плацентној патологији нема научни ни клинички значај али упоредо испитивање приликом порођаја показало је позитивну корелацију повишених вредности биомаркера ОС у крви мајке и крви из умбиликалне врпце новорођенчета(91).

Начин порођаја могао би значајно утицати на повишен ниво биомаркера ОС код новорођенчета, где су ове вредности значајно повећане код пролонгираног вагиналног порођаја и хитног царског реза као и код стимулисаног порођаја окситоцином. (75,92–94) Утицај оксидативног стреса мајке на оксидативни стрес плода зависи од антиоксидативног капацитета новорођенчета који је детерминисан генетски, у зависности од пола плода, зрелости плода као и старости мајке. (75)

Табела 1. Најчешће коришћени биомаркери оксидативног стреса у трудноћи.

Показатељи липидне пероксидације	Malondialdehyde (MDA) (95) Thiobarbituric Acid reactive substances (TBARS) (96)
Индикатор оксидативног оштећења липида	Lipid peroxidation (LPO) (97)
Биомаркер оштећења ДНК	8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) (98)
Ензим повезан са оксидативним стресом пуринских метаболита	Xanthine oxidase (XO) (99)
Показатељ укупне антиоксидативне заштите	Total antioxidant capacity (TAC) (95)
Показатељ оксигенације протеина	Advanced oxidation protein products (AOPP) (100)
Ензим одговоран за супресију супероксидних радикала	Superoxide dismutase (SOD) (101)
Задужен за редукцију водоник пероксида и липидних пероксида	Glutathione peroxidase (GPx) (102)
Ензим задужен за супресију водоник пероксида	Catalase (CAT) (103)
Водећи антиоксидативни молекул	Glutathione (GSH) (104)
Молекул задужен за детоксикацију	Glutathione transferase (GST) (105)
Показатељ укупног нивоа оксидативног стреса	Oxidative stress index (OSI) (106)
Биомаркер активације неутрофила означава протеинску оксигенацију	Myeloperoxidase (MPO) (107)

1.1.5.3 Хистопатолошке промене постељица инфицираних пацијенткиња

Плацента поред своје нутритивне, екскреторне, оксигенационе, хормонске функције има важну протективну улогу и представља главну баријеру ширењу бактеријских и вирусних инфекција на плод. Сама та улога предиспонира постељицу утицају како самог SARS-COV-2 вируса тако и последицама системске инфекције, коагулационим и оксидативним поремаћајима који карактеришу COVID-19. Испитивање промена које настају у самој постељници пружа нам јединствену прилику да разоткријемо механизме којима вирус утиче на трудноћу и плод. Бројне студије бавиле су се испитивањем макроскопских и микроскопских патохистолошких промена унутар

постељичног ткива код пацијенткиња инфицираних током трудноће али су резултати некохерентни. (108–114) Слабе стране ових студија представљају: мали број узорака, недоследност у класификацији патохистолошких промена, збуњујући фактори као што су хроничне болести у трудноћи и животне навике које могу имати значајан утицај на резултат као и избор контролне групе.

Поједине студије детектовале су учестало присуство патохистолошких промена по типу матерналних васкуларних малперфузија (MVM), док су друге наводиле промене по типу феталних васкуларних малперфузија (FVM), дијагностикованих према консензусу радне групе за патологију постељице постигнутом у Амстердаму на основу стране постељице на којој су настале. (115–119) Поред васкуларних промена поједине студије доказале су и присуство инфламационих хистопатолошких промена унутар постељица пацијенткиња заражених SARS-COV-2. (120)

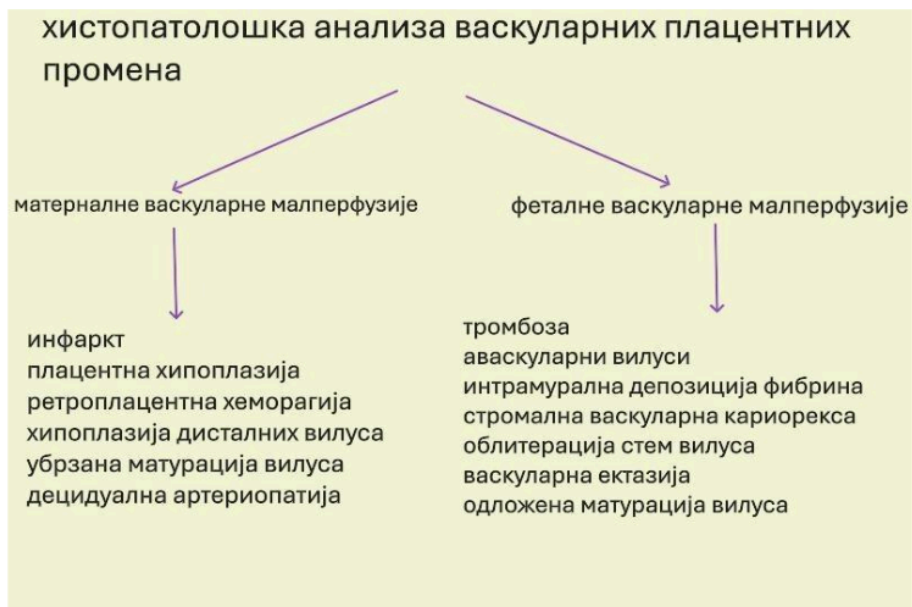
Обзиром да је раст и развој постељице динамичан процес диригован генетски и имунолошки, тренутак када је дошло до SARS-COV-2 инфекције током трудноће може бити важан фактор у настанку патохистолошких промена и последичног матерналног и феталног исхода. (115,121)

MVM обухвата спектар макроскопских и микроскопских промена плаценте. Ове промене резултат су исхемијског (хипоксичног) оштећења и оксидативног стреса. (122) Макроскопске промене су: хипоплазија постељице (тежина <10. перцентила), сужена пупчана врпца (пречник мање од 0,8 cm у термину), инфаркт и ретроплацентарно крварење. (123–125) Микроскопске лезије постељице обухватају: хипоплазију дисталних ресица и убрзано сазревање ресица при чему дисталну хипоплазију ресица представљају увећани међувилосни простори између танких и издужених ресица који заузимају доње две трећине паренхима пуне дебљине, обухватајући најмање 30% препарата. (123,124,126) Убрзано сазревање ресица описано је као присуство хипер-зрих ресица за дато гестационо доба, појачано нодулирање синцицијума и повећање таложња фибрина у интервилосним просторима. (123,126,127)

(FVM) Феталне васкуларне малперфузије су специфичне лезије плаценте које настају као резултат опструкције феталног крвотока. Могу потицати од пупчане врпце (хиперкоиловање пупчане врпце), од хиперкоагулабилности, хипоксије и оштећења ендотела посредованог упалом (акутни хориоамнионитис са хорионским васкулитисом или фунизитисом и хроничним вилитисом) (124,125,128–130). На основу опсежности патолошких промена FVM се може класификовати као Low-grade FVM и High-grade FVM, при чему се промена класификује као High-grade FVM уколико се на испитиваном препарату налази преко 45 аваскуларних вилуса у 3 испитивана поља, са или без тромбозе или налаз два или више оклудирајућа или неоклудирајућа тромба унутар хорионског лежишта или више различитих неоклузивних тромба. (131)

Према Амстердамском консензусу, FVM представљају следећи налази: тромбоза, сегментне аваскуларне ресице, вилозна стромално-васкуларна кариорекса, васкуларна интрамурална депозиција фибрина, облитерација крвних судова/фибромускуларна склероза и васкуларна ектазија. (124)

Схема 1: *Врсте васкуларних пато-хистолошких лезија класификоване према Амстердамском консензусу*



Инфламаторне промене детектоване у ткиву постељице карактерише хронични вилитис. (132) Хронични вилитис може бити последица вирусних инфекција, али у већини случајева није идентификована етиологија а карактерише га пораст инфилтрације плацентног ткива лимфоцитима унутар вилуса праћен порастом Хофбауерових ћелија. (133)

Плацентно ткиво богато је макрофазима мајке и плода који имају важну улогу током самог процеса плацентације, имуног одговора у трудноћи и покретања механизма порођаја. (134,135) Сами макрофаги мајке поседују на својој површини ACE2 рецепторе што потенцијално омогућава везивање SARS-COV-2 вируса и директну трансмисију на плод путем постељице током инфламације, посебно током хориоамнионитиса. (53,136) Хофбауерове ћелије, које представљају постелничне (феталне) макрофаге лоциране су у строми хорионских вилуса, локализоване у непосредној близини феталних крвних судова и трофобласта, поседују класичне маркере макрофага/моноцита као што је CD68. (137–139) Поред Хофбауерових ћелија експресију CD68 унутар постељица мајки заражених SARS-COV-2 поседују и хистиоцити на нивоу децидуе. (140) Хистиоцитна инфилтрација интервилозног простора карактеристика је хроничног хистиоцитног интервилитиса, ретког патолошког ентитета непрепознате етиологије који је веома често повезан са лошим перинаталним исходом (141).

Повезаност хистопатолошких промена постељица са исходом трудноће

Претходне опсервационе студије које су се бавиле проблемом MVM показале су да су ове промене биле асимптоматске, али кумулативни ефекат се огледао у хиперперфузији постељице који води ка неповољном перинаталном исходу и феталним компликацијама и повезан је са прееклампсијом и интраутериним застојем у расту плода (IUGR)(122,142–144) IUGR по дефиницији представља плод који током интраутериног раста и развоја не достигне свој генетски потенцијал и присутан је у чак 15% трудноћа. (145)

FVM лезије повезане са абнормалностима неонаталног централног нервног система, IUGR, интраутерином смрћу фетуса и мртворођеношћу. (115,130,146,147)

Хронични хистиоцитни вилитис непознате етиологије повезан је са неповољним перинаталним исходом који карактеришу: IUGR, прематуритет, фетална смрт, рекурентни побачаји и лезије централног нервног система плода. (148)

3. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ РАДА

2.1 Главни циљ истраживања

1. Утврдити типове и учесталост патохистолошких промена постеличног ткива код пацијенткиња код којих је у трудноћи потврђена инфекција SARS-COV-2 и упоредити их са контролном групом.

2. Утврдити присуство (ACE2) рецептора на ћелијама синциотрофобласта имунохистохемијском методом.

3. Утврдити присуство Spike протеина у ћелијама постелице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће имунохистохемијском методом и упоредити са контролном групом.

4. Утврдити експримирање CD68+ маркера унутар постеличног ткива имунохистохемијски код пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и упоредити са контролном групом.

3. Утврдити присуство IgM At у крви новорођенчета код мајки инфицираних вирусом SARS-COV-2 током трудноће ради доказивања могућности вертикалне трансмисије на плод.

4. Утврдити из плазме и лизата еритроцита крви мајке непосредно пред порођај и крви новорођенчета из пупчаника вредности параметара антиоксидативног система заштите, као и про-оксиданаса: индекс липидне пероксидације мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2), каталаза (CAT), супероксид дизмутаза (SOD), редуковани глутатион (GSH).

5. Утврдити неонатални исход: Апгар скор, телесну тежину новорођенчета, пријем на одељење интензивне неге, дужину боравка новорођенчета на одељењу неонатологије.

2.2 Специфични циљеви

1. Испитати значајност разлике хистопатолошких промена постеличног ткива између различитих група пацијенткиња код којих је у трудноћи потврђена инфекција SARS-COV-2 формираних у односу на триместар у коме се десила инфекција и у односу на тежину клиничке слике.

2. Испитати испољеност патохистолошких промена постеличног ткива у односу на ниво оксидативног стреса код пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће.

3. Испитати степен корелације експресије Spike протеина у ћелијама трофобласта са нивоом оксидативног стреса код пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће.

4. Испитати степен корелације експресије Spike протеина у ћелијама трофобласта са перинаталним исходом новорођенчета.

5. Утврдити значајност разлике нивоа биомаркера оксидационог стреса код различитих група пацијенткиња код којих је у трудноћи потврђена инфекција SARS-COV-2 формираних у односу на триместар у коме се десила инфекција и у односу на тежину клиничке слике

6. Утврдити значајност разлике капацитета антиоксидационе заштите код различитих група пацијенткиња код којих је у трудноћи потврђена инфекција SARS-COV-2 формираних у односу на триместар у коме се десила инфекција и у односу на тежину клиничке слике

7. Испитати степен корелације вредности маркера оксидационог стреса и система антиоксидационе одбране са патохистолошким променама постеличног ткива код пацијенткиња код којих је у трудноћи потврђена инфекција SARS-COV-2

8. Испитати степен корелације хистопатолошких промена постеличног ткива и присуство IgM At у крви новорођенчета у првом дану живота

2.3 Хипотезе рада

1. Постоји статистички значајна разлика у учесталости патохистолошких промена постеличног ткива код пацијенткиња код којих је потврђена SARS-COV-2 инфекција током трудноће у односу на контролну групу
2. Могућа је вертикална трансмисија SARS-COV-2 са мајке на плод
3. Постоји статистички значајан повишен ниво биомаркера оксидативног стреса у крви мајке и пучаника код пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу
4. Постоји статистички значајна разлика у неонаталном исходу новорођенчади мајки оболелих од COVID-19 у односу на контролну групу.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Врста студије

Спроведена је опсервациона ретроспективно-проспективна клиничка кохортна студија која има у фокусу труднице које су се породиле на акушерском одељењу ГАК УКЦ Крагујевац са подручја Шумадијског округа, старости 18-42 године праћених од тренутка позитивног SARS-CoV-2 теста до отпуста са породилишта и новорођенчета са одељења неонатологије. Истраживање је спроведено на Клиници за Гинекологију и акушерство Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу и Центру за Физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Студија је одобрена од стране Етичког одбора Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу (број одлуке 01/21-18 од 28.01.2021.). Истраживање је финансирано средствима из Јуниор пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (ЈП 13/21).

Истраживање је трајало 24 месеца и сва испитивања спроведена су током периода хоспитализације и амбулантних прегледа испитаница. Све пацијенткиње које су учествовале у испитивању биле су упознате са поступком истраживања и њеницом да ће се њихови лични подаци и резултати анализе биолошких материјала користити искључиво у научно-истраживачке сврхе. Пацијенткиње су дале сагласност за учешће у студији потписивањем информисаног пристанка. Протокол истраживања се придржавао њих важених принципа Хелсиншке декларације Светске медицинске асоцијације као и Добре клиничке праксе Међународне конференције за хармонизацију.

3.2 Место обављања истраживања

Истраживање је спроведено на Клиници за гинекологију и акушерство Универзитетског клиничког центра Крагујевац и Центру за Физиологију Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Узорци биолошког материјала узорковани су на пријемно-дијагностичком одељењу и породилишту Клинике за гинекологију и акушерство Универзитетског клиничког центра Крагујевац.

Анализа биолошког материјала обављана је у:

- Вирусолошкој лабораторији УКЦ Крагујевац (RT-PCR, брзи антигенски тест, серолошко испитивање IgG и IgM антитела)
- Служби за патоанатомску дијагностику, УКЦ Крагујевац (НЕ бојење и хистолошка анализа постеличног ткива, имунохистохемијска испитивања постеличног ткива),
- Центру за физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (испитивање биомаркера оксидативног стреса)

3.3 Популација која се испитује

Из популације трудница контролисаних, лечених и порођених на гинеколошко акушерској клиници Клиничког центра у Крагујевцу издвојене су две кохорте:

1. пацијенткиње које су током трудноће имале позитиван резултат на присуство SARS-CoV-2 RT-PCR методом и/или брзим антиген тестом.
2. контролна кохорта су пацијенткиње које приликом пријема на ГАК имале негативан резултат брзог антигенског или RT-PCR SARS-CoV-2, које су анамнестички биле асимптоматске током трудноће и имају негативан серолошки тест на присуство IgG и IgM SARS-CoV-2 антитела.

Испитивање је обухватило укупно 50 испитаница сврстаних у групе на основу тежине клиничке слике и триместра у коме се десила SARS-CoV-2 инфекција.

У односу на тежину клиничке слике пацијенткиње унутар испитиваних кохорти подељене су на:

1. Асимптоматска инфекција /Умерено тежак облик клиничке слике (фебрилност, малаксалост, кашаљ)
2. Изражена/Тешка клиничка слика (диспноја, пнеумонија, потреба за кисеоником)

Унутар кохорте трудница које су током трудноће имале позитиван тест на присуство SARS-COV-2 у односу на старост гестације у којој се догодила инфекција издвојене су три подгрупе пацијенткиња код којих ће се упоредно пратити утицај COVID-19 на ткиво постељице:

1. Пацијенткиње код којих је утврђено присуство SARS-COV-2 у првом триместру трудноће (од утврђивања трудноће до краја 13. недеље гестације)
2. Пацијенткиње код којих је утврђено присуство SARS-COV-2 у другом триместру трудноће (од 14 до краја 27. недеље гестације)
3. Пацијенткиње код којих је утврђено присуство SARS-COV-2 у трећем триместру трудноће (од 28. до 42. недеље гестације)

3.3.1. Испитаници

У овој истраживачкој студији је учествовало 50 трудница старости од 18 до 42 године, порођених природним, вагиналним путем (са или без епизиотомије) или царским резом на Акушерском одељењу ГАК УКЦ Крагујевац. Прву, експерименталну групу чиниле су труднице које су током актуелне трудноће имале симптоматски или асимптоматски облик COVID-19 са доказаним присуством SARS-COV-2 путем RT-PCR теста или брзог антигенског теста. Контролну групу чиниле су труднице такође порођене вагиналним путем (са или без епизиотомије) или царским резом које негирају током трудноће обољевање од COVID-19, негирају блиски контакт са зараженом особом у последњих 7 дана и имају негативан серолошки налаз IgM и IgG антитела на SARS-COV-2 из крви узорковане приликом пријема на акушерско одељење ради порођаја.

3.3.1.1. Критеријуми за укључивање испитаника у студију

1. Потписан формулар о информисаном пристанку за учешће у испитивању трудница старости 18 до 42. године примљених на акушерско одељење ГАК УКЦ Крагујевац ради контроле трудноће и порођаја.
2. Пацијенткиње које су примљене ради порођаја на гинеколошко акушерску клинику Клиничког центра у Крагујевцу а имале су позитиван резултат RT-PCR и/или брзог антиген тест на SARS-COV-2 током трудноће.

3.3.1.2. Критеријуми за искључивање испитаника из студије

1. позитивна лична анамнеза на присуство тромбоемболијских болести, тромбофилије, антифосфолипидног синдрома и коришћење антикоагулантне терапије
2. пацијенткиње које болују од дијабетеса мелитуса,
3. пацијенткиње које болују од системског лупуса еритематодеса,
4. пацијенткиње које болују од хипертензивних поремећаја у трудноћи или пре постојеће хроничне хипертензије,
5. пацијенткиње чије трудноћа је компликована РН инкопатибилијом

6. пацијенткиње које су активни пушачи или су конзумирале цигарете у периоду претходне 3 године

7. пацијенткиње вакцинисане пре или током трудноће против COVID-19

8. повреда протокола истраживања

9. добровољно напуштање започетог учешћа у студији

3.4 Врста биолошког материјала

Након добијања сагласности за учешће у испитивању путем информисаног пристанка приступали смо прикупљању биолошког материјала који је подразумевао код обе групе:

1. Н₄офарингеални брис
 2. 5 ml крви из кубиталне вене испитанице ;
 2. 5 ml крви из умбиликалне вене пупчане врпце новорођенчета.
 4. комплетно постелично ткиво са плодовим овојцима;
 5. 2 ml венске крви новорођенчета
- Код контролне групе још и
6. 5 ml крви из кубиталне вене испитанице

3.4.1. Узорковање биолошког материјала

3.4.1.1. Узорковање назофарингеалног бриса

Приликом пријема на акушерско одељење ГАК УКЦ Крагујевац као стандардна процедура предвиђена протоколом за сузбијање COVID-19 пандемије вршило се код свих пацијенткиња узимање назофарингеалног бриса ради анализе присуства SARS-COV-2 Ag брзим тестом. Брис се узима стерилним штапићима под контролом ока.

3.4.1.2. Узорковање крви кубиталне вене испитаница

Испитаницама обеју група (експерименталне и контролне) узимали смо узорак крви на порођају пре фазе експулзије у количини од 5 ml поштујући принципе антисепсе помоћу Vacuteiner система у хепаринизирану стерилну епрувету ради испитивања биомаркера оксидативног стреса. Контролној групи смо додатно узимали приликом пријема на акушерско одељење ради порођаја на исти начин узорак од 5 ml венске крви из кубиталне вене ради серолошког испитивања присуства IgM и IgG антитела на SARS-COV-2.

3.4.1.3. Узорковање крви умбиликалне вене пупчаника

Непосредно након порођаја, у првим минутима живота узимали смо крв из умбиликалне вене, након клемовања пупчаника помоћу две стерилне пластичне клеме, поштујући принципе антисепсе. Узорковање смо вршили помоћу Vacuteiner система у хепаринизирану стерилну епрувету ради испитивања биомаркера оксидативног стреса.

3.4.1.4. Узорковање постеличног ткива

Након порођаја приступали смо узорковању постеличног ткива у строго контролисаним условима поштујући принципе антисепсе. Читав постелични диск заједно са пупчаником и овојницама је потапан у раствор формалина у хемијски и биолошки чисте посуде ради елиминисања евентуално присутног вируса а затим допреман Служби са патохистолошку дијагностику УКЦ Крагујевац.

3.4.1.5. Узорковање венске крви новорођенчета

Током првих сати живота, у првом дану код новорођенчета је узорковано 2 ml венске крви из кубиталне вене строго поштујући принципе антисепсе у стерилне хепаринизирани епрувете ради серолошког испитивања присуства IgM антитела на рођењу.

3.4.2. Достављање и чување биолошког материјала

Достављање и чување биолошког материјала је обављено у складу са принципима Добре клиничке праксе и Добре лабораторијске праксе. Назофарингеални брис је допреман у затворен у стерилним епруветама, транспортован хладним контејнерима, чуван на температури -80 C° и допреман одмах Вирусолошкој лабораторији УКЦ Крагујевац како би се спречила евентуална контаминација или разградња вируса.

Крв из кубиталне вене мајке и из пупчаника је одмах по узимању узорка допремана Институту за физиологију где је центрифугирана и раздвајана у серум и преципитат и чувана на температури -20 до коначних анализа биомаркера оксидативног стреса.

Крв из кубиталне вене испитаница контролне групе је након прикупљања достављана Вирусолошкој лабораторији УКЦ Крагујевац ради испитивања присуства анти SARS-COV-2 IgG и IgM антитела комерцијалним ELISA тестовима.

Постељично ткиво је у формалинском раствору у чистим посудама допремано Служби за Патохистолошку дијагностику унутар 24ч након порођаја ради даље обраде и бојења као и припреме за ИХХ анализе.

Венска крв новорођенчета је у стерилним епруветама допремана лабораторији ради одређивања присуства IgM антитела УКЦ Крагујевац ради испитивања присуства анти SARS-COV-2 IgM антитела комерцијалним ELISA тестовима.

3.5. Варијабле које се мере у студији

3.5.1. Независне варијабле:

RT-PCR и/или брзи антигенски тест назофарингеалног бриса на присуство SARS-COV-2. Код свих пацијенткиња на пријему на акушерско одељење Гинеколошко акушерске клинике Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу, према важећем протоколу о пријему на одељење у условима пандемије COVID-19, узет је назофарингеални брис за брзи антигенски SARS-COV-2 тест или RT-PCR тест.

3.5.1.1. Брзи антигенски тест назофарингеалног бриса на присуство SARS-COV-2 представља имунолошко испитивање присуства специфичних виралних протеина који се зову антигени. Позитиван резултат означава присуство антигена односно активну инфекцију. У случају постојања симптоматологије порекла респираторних органа код пацијенткиња је узиман и назофарингеални брис ради RT-PCR анализе. Сензитивност брзог антигеног теста у односу на RT-PCR тест износи 46%, а у односу на културу вируса 80% али има најбољи однос цене и добити у условима брзо ширеће пандемије(149) Додатна предност овог теста је што се резултат доступан за 15 минута те је могуће у моменту пријема вршити тријажу пацијенткиња, за разлику од RT-PCR теста за чију је израду потребно и неколико дана. (150)

3.5.1.2. RT-PCR SARS-COV-2 тест представља златни стандард у детекцији SARS-COV-2 или његових партикула. Темљи се на детекцији присуства вирусне RNK

у испитиваном узорку ткива и зависи од адекватног узорковања и чувања узорка до момента анализе. (151) Сви узорци чувани претходно максимално до 72ч на температури -80C° анализирани су у специјализованој вирусолошкој лабораторији у УКЦ Крагујевац. Из прикупљених узорака најпре је изолована RNK вируса помоћу комерцијалних китова за екстракцију. Након тога у главну смешу се додаје ензим реверзна транскриптаза (у нашем истраживању High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) како би се синтетизовала комплементарна DNK (cDNA) а затим се врши инкубација како би се започела реакција. Смеша у којој се налази cDNA заједно са прајмером, дестилованом водом, DNK сондом или SYBR зеленим се пипетира на миолитар плоче од 96 места а затим се смешта у qRT-PCR апарат где се изводи реакција на основу температурне шеме а добијена комплементарна DNK је коришћена је за квантификацију експресије гена. (Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR).

3.5.2. Зависне варијабле:

3.5.2.1. Патохистолошке промене

Дефинисане су према консензусу радне групе за патологију постељице постигнутом у Амстердаму.

Након прикупљања целокупног постељичног диска заједно са овојницама и пупчаником и фиксирања у 4% раствору формалдехида током 24 ч како би се неутралисала евентуална инфективност, правилно обележен материјал достављан је Служби за патоанатомску дијагностику УКЦ Крагујевац где се најпре приступало макроскопској анализи постељице.

Макроскопски изглед постељице и пупчаника анализиран је према препорукама амстердамског консензуса који се бавио проблемом патологије постељице и обухватао је: мерење масе постељице, димензије постељичног диска, опис матерналне и феталне стране постељице, инсерцију пупчаника, опис пупчаника, опис плодових овојака, а затим је приступано прикупљању узорака ткива. (131)

3.5.2.1.1. Прикупљање ткивних узорака

Узорци су прикупљани такође према препорукама амстердамског консензуса. (131) Узето је 6 узорака:

- најпре узорак амнионских овојака од места руптуре ка ивици постељице и
- две узорка попречног пресека пупчаника, један са феталне а други на око 5 cm од матерналне инсерције
- још 3 исечка плацентног диска пуне дебљине изрезаних скалпелом, који обухватају матерналну и феталну страну узетих из централне две трећине површине постељице а један са самог места инсерције.

Обрада ткива: дехидратација, испирање и импрегнација је извршена ткивним процесором а затим је укалупљено у парафинске блокове. Затим смо помоћу ротирајућег микротом (Leica RM2135), извршили сечење ткива на узорке дебљине 5 µm, на собној температури који су затим потапани у 14 дено купатило на температури од 400C. На тај начин обрађени пресеци наношени су на предметна стакла (Superfrost-OT Plus microscope slides) за микроскопирање.

3.5.2.1.2. Бојење хематоксилин-еозин техником

Како би смо извршили депарафинисање ткива било је неопходно да предметна стакла најпре изложимо загревању на +56°C а затим спонтаном хлађењу. Након тога их потапамо у ксилол узастопно два пута у трајању од по 5 минута. Кад смо извршили

депарафинисање ткива приступамо рехидратацији ткива тако што предметна стакла потапамо у растворе са опадајућим концентрацијама етил-алкохола а затим испирамо дестилованом водом. Следећи корак подразумевао је бојење раствором по Mayeru (Sigma Aldric, USA) током 10 мин, где се након испирања дестилованом водом приступило бојењу алкохолним раствором еозина (Sigma Aldric, USA) током наредна 2 минута. Затим је извршен процес дехидратације који је подразумевао потапање предметних стакала сада растућим концентрацијама етил-алкохола а након тога просветљавање помоћу два раствора ксилола, сваки током 5 мин. (152) На овај начин припремљене плочице су након третирања медијумом за покривање заштићене покровним стаклима и осушене на собној температури. Анализу је вршила независно двоје искусних патолога који се баве патологијом постелице на светлосном микроскопу марке Olympus BX51, Japan. У случају неусклађених резултата пресудан је био став трећег патолога.

3.5.2.1.3. Имунохистохемијска анализа

Приликом извођења имунохистохемијске анализе ткива постелице ради детекције присуства CD68+ леукоцита, ACE2 рецептора и S протеина водили смо се смерницама произвођача. Најпре смо приступили депарафинисању и рехидратацији ткивних исечка а затим смо вршили пуфровање кивета са предметним стаклима са исечцима у цитратном пуферу рН вредности 6.0 на собној температури. Након тога из цитратног [4](#) пуфера препарати су испирани најпре дестилованом водом а затим раствором PBS-a (Phosphate Buffered Saline) рН вредности 7.2, и након тога третирана раствором ацетона и на крају испирана раствором PBS у три наврата. Следећи корак је пре инкубације је представљало апликовање капи Hydrogen Peroxide Block-a и најзад испирање у раствором PBS-a. Пре наношења примарног антитела и инкубације ткивни исечци су третирани наношењем комерцијалног протеинског блока како би се онемогућило везивање појединих неспецифичних протеина. (153)

Примарна антитела која смо користили су:

- Anti-ACE2 antibody [EPR4436] Abcam
 - Anti-CD68 antibody [EPR20545] Abcam
 - SARS-COV-2 spike glycoprotein antibody - Coronavirus 7Abcam
- Секундарно антитело коришћено у студији
- Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) Abcam

Следећи корак у припреми препарата представљало је одливање вишка антитела и наношење секундарног антитела иза кога је уследила инкубација од 45 мин на собној температури. Након даље обраде помоћу раствора PBS-a уследило је наношење раствора HRP/AEC реагенса и испитање дестилованом водом. Финални корак је представљало бојење по Mayer-у. (152) Након финалног бојења и испирања препарати су третирани помоћу глицерола и покривени покровном луспицом. Анализирани су независно од стране двоје искусних патолога који се баве патологијом постелице на светлосном микроскопу марке Olympus BX51, Japan на увећању 100x, 200x и 400x. Током анализе учињене су и фотомикрографије. У случају неусклађених резултата пресудан је био став трећег патолога.

Скорирање имунохистохемијских резултата у анализи експресије Anti-ACE2 антитела као и SARS-COV-2 Spike гликопротеин антитела је обављено помоћу опсервирања и мануелног бројања следећих параметара:

Интензитет бојења: Додељује се скор 0-3.

- 0- без пребројавања- идентично негативној контроли
- 1- слабо пребројавање
- 2-умерено пребројавање
- 3-јако пребројавање

Скор за проценат позитивних ћелија: Додељује се скор 0-3.

- 0- 0% обојених ћелија
- 1: <10% обојених ћелија
- 2: 10-50% обојених ћелија
- 3: >50% обојених ћелија

Множењем скорa интензитета са скором процентуалне заступљености добијамо комбиновани скор ради прецизније интерпретације резултата.

Скорирање у анализи експресије Anti-CD68+ анитела обављено је квантитативно, мануелно бројењем CD68+ ћелија у 5 суседних High Power Filds на увећачу 400x. Израчунавали смо средњу вредност збира CD68+ ћелија у 5 суседних поља. Ради стандардизације доделили смо скорове средњим вредностима те је:

- 0 = одсуство CD68+
- 1: <10 CD68+ ћелија по HPF
- 2: 11-50 ћелија по HPF
- 3: >50 ћелија по HPF

3.5.2.2. Одређивање параметара оксидативног система заштите као и про-оксиданаса

Одређивање параметара оксидативног система заштите као и про-оксиданаса вршено је одређивањем индекса липидне пероксидације мереним као TBARS, азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анион радикал (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2), каталазе (CAT), супероксид дигмутаза (SOD), редукваног глутатиона (GSH).

Припрема узоракa за одређивање параметара ОС, непосредно након узорковања периферне крви мајке пред порођај и крви из пупчаника новорођенчета, извршена је у лабораторији Института за Физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Узорак од 5 ml крви је узиман је у кивету са ЕДТА и центрифугиран током 10 минута на 3000 обртаја како би се раздвојили плазма и еритроцити. Након издвајања 1 ml добијене плазме се чувао у замрзивачу на -80°C до извођења поступка за одређивање параметара антиоксидационог система. Након тога су се приступало издвајању еритроцита додавањем физиолошког раствора у односу 1:3 а након чега је извршено мешање на вортексу, а потом у три суксесивна наврата центрифугирање током следећих 10 минута, брзином од 3000 обртаја. Из кивете је путем аспирације издвојен супернатант а након тога извршено издвајање еритроцита у посебну стаклену епрувету у коју се додаје 3 ml дестиловане воде ради постизања хемолитичке рекације. Добијени хемолизат је даље процесуиран хлађењем током 30 минута у леденом купатилу а затим се чувао у замрзивачу на -80°C до коначног одређивања параметара оксидационог стреса у лабораторији Института за Физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Из узоракa плазме вршили смо анализу прооксидативних биомаркера (O_2^- , H_2O_2 , TBARS, NO_2^-) а из хемолизата анализу антиоксидативних бимаркера (CAT, GSHPx, SOD, GSH) извођењем спектрометрије на апарату (UV-1800 Shimadzu UV spectrophotometer, Japan)

3.5.2.2.1. Одређивање концентрације Супероксида (O_2^-)

Одређивање концентрације супероксида (O_2^-) је утемељено на реакцији Nitro-Blue Tetrazolium (TRIS Buffer) са узорком плазме, мерено на таласној дужини од 530nm, при чему се као слепа проба користио узорак дестиловане воде. (154)

3.5.2.2.2. Одређивање концентрације H_2O_2

Одређивање концентрације H_2O_2 смо вршили на основу оксидације фенол црвеног уз помоћ H_2O_2 која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (Horse Radish Peroxidase - HRPO). Узимали смо 200 μ l узорка плазме и преципитирали је помоћу 800 μ l раствора Фенол црвеног уз додатак 10 μ l HRPO у односу 1:20 HRPO. Као слепа проба нам је користила еквивалентна количина раствора Krebs-Henseleit. Мерења концентрације H_2O_2 смо извршили на таласној дужини од 610nm. (155)

3.5.2.2.3. Одређивање индекса пероксидације

Одређивање индекса пероксидације изражено ка TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) на основу продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитуратном киселином вршено је из узорка плазме користећи 1% раствор тиобарбитуратне киселине у 0,05ml NaOH, инкубиран заједно са узорком плазме у количини од 0.8ml на температури од 100°C током 15 мин. Мерење је спроведено на таласној дужини 530 nm wavelength. (156)

3.5.2.2.4. Одређивање концентрације нитрита (NO_2^-)

Концентрација нитрита (NO_2^-) под директним је утицајем нивоа азот монооксида. Концентрација је мерена користећи се методом по Green-и користивши Griess-ov реагенс. (157) Узорак плазме је био преципитиран помоћу 200 μ l 30% сулфа-салицилне киселине, помешан у вортексу током 30 минута а затим је извршено центрифугирање на 3000g. На овај начин добијени супернатант смо помешали са Griess-овим реагенсом у једнакој запремини а затим извршили инкубацију током 10 мин у тамном инкубатору. На крају поступка смо вршили мерење на таласној дужини од 550 nm.(157)

3.5.2.2.5. Одређивање активности каталазе (CAT)

Анализа активности каталазе се врши на основу методе по Aebi-y. (158)

Најпре смо извршили разређивање хемолизата дестилованом водом у односу 1:7. 100 μ l узорка хемолизата је затим помешано са једнаком запремином етанола заједно са 50 μ l CAT пуфера и 1000 μ l 10 mM H_2O_2 . Активност каталазе је затим одређивана спектрофотометријски на 230nm таласне дужине. (158)

3.5.2.2.6. Одређивање активности супероксид дизмутазе (SOD)

Активност супероксид дизмутазе се врши методом по Beutler-y.(159) У епендорфу смо најпре помешали 100 μ l хемолизата заједно са 1 ml карбонатног пуфера а затим смо узорак процесуирали у вортексу и напосле додали 100 μ l адреналина. Спектрофотометрију смо обавили на таласној дужини од 470nm.(159,160)

3.5.2.2.7. Одређивање концентрација редукованог глутатиона (GSH)

Одређивање концентрације редукованог глутатиона (GSH) врши се методом по Beutler-y(159) Ова анализа се темељи на реакцији оксидације GSH са 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензоевом киселином. Спектрофотометријска мерења смо извршили на таласној дужини од 412nm.

3.5.2.3. ELISA (Enzyme-Linken Immunosorbent Assay) методом IgM SARS-COV-2 антитела у венској крви новорођенчета IgM и IgG антитела у венској крви мајке

3.5.2.3.1. ELISA (Enzyme-Linken Immunosorbent Assay) методом IgM и IgG антитела у венској крви мајке

Како би смо потврдили да испитанице сврстане у контролну групу нису прележале асимптоматску COVID-19 инфекцију, уз податак о негативној анамнези на вирусне инфекције током трудноће, укључујући фактор у контролну групу био је негативан налаз антитела IgM и IgG на SARS-COV-2 у у венској крви испитаница. Након узорковања венске крви мајке и допремања у вирусолошку лабораторију Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу приступило се обради узорака. Најпре је извршено центрифугирање током 10 минута на 300G ради издвајања серума који смо користили у анализи. Користили смо комерцијалне ELISA китове специфичне за одређивање SARS-COV-2 антитела и то: Human SARS-COV-2 Spike (Trimer) IgM ELISA Kit и Human SARS-COV-2 Spike (Trimer) IgG ELISA Kit који користе сендвич метод. Бунарчићи микроплоче су претходно обележени тримеризованим Spike протеином у које се затим додају узорци плазме и контроле. Овде се изврши реакција везивања за имобилизовани Spike протеин. Бунари се перу и додају се IgG антитела коњугована са HRP-ом и везују се за сва заробљена антитела. Бунари се перу и додаје се раствор супстрата који реагује са комплексом ензима да би произвео мерљив сигнал. Интензитет овог сигнала је директно пропорционалан концентрацији антитела присутног у оригиналном узорку. Према протоколу овог стандардног Human SARS-COV-2 Spike (Trimer) IgM ELISA Kit и Human SARS-COV-2 Spike (Trimer) IgG ELISA Kit најпре смо вршили испирање бунарчића два пута помоћу комерцијалног Wash Buffer-а а затим смо додали 90µL 1X Assay Buffer у све бунарчиће осим оне са празнинама. Додавали смо 10 µL стандарда, контроле или узорака у одговарајуће бунарчиће. Затим смо додали 100 µL 1X Assay Buffer у бунарчиће прекида. Прекрили смо са покровном фолијом и инкубирали 30 минута на 37°C. Аспирирали смо раствор и испирали бунарчиће 3 пута помоћу пуфера за испирање. Након тога смо додавали 100µL 1X HRP коњугованог раствора у сваки бунарчић и инкубирали 30 минута на 37°C. Додавали смо 100 µL раствора субстрата у сваки бунарчић до појављивања плаве боје затим инкубирали током 15мин на собној температури. Након тога је додавано 100 µL Stop раствора у сваки бунарчић и боја је прелазила из плаве у жуту. Одмах по настанку жуте боје читаван је резултат на колориметријском микроплет читачу на 450nm. IgM+IgA и IgG Квалитативна анализа резултата врши се на основу формуле:

$$\text{однос апсорбције} = \frac{\text{апсорбција узорка}}{\text{апсорбција калибратора}}$$

Ако овај однос износи <0,4 циљани IgA + IgM је одсутан.

- Ако је однос 0,4–0,6, резултат је интермедијарни.
- Ако је однос >0,6 циљани IgA + IgM је присутан
- Поделити апсорпцију Low Control абсорбцијом калибратора као негативну контролу (ratio <0,4).
- Поделити апсорпцију High Control калибратором ради добијања негативне контроле (ratio >0,6).

Код одређивања присуства IgG користимо следеће вредности:

Ако овај однос износи <1,4 циљани IgG је одсутан.

- Ако је однос 1,4–1,6 резултат је интермедијарни.
- Ако је однос >1,6 циљани IgG је присутан
- Поделити апсорпцију Low Control абсорбцијом калибратора као негативну контролу (ratio <0,4).
- Поделити апсорпцију High Control калибратором ради добијања негативне контроле (ratio >0,6).

3.5.2.3.2. ELISA (Enzyme-Linken Immunosorbent Assay) методом IgM SARS-COV-2 антитела у венској крви новорођенчета

У првим сатима након рођења након пристанка мајке под строго антисептичним условима узимано је 2ml венске крви новорођенчета ради одређивања присуства IgM SARS-COV-2 антитела. Крв је одмах након узимања допремана вирусолошкој лабораторији у којој је вршена обрада и анализа узорка. Најпре је извршено центрифугирање током 10 минута на 300G ради издвајања серума који смо користили у анализи.

Користили смо комерцијалне ELISA китове специфичне за одређивање SARS-COV-2 антитела и то: Human SARS-COV-2 Spike (Trimer) IgM ELISA Kit који користе сендвич метод. Бунарчићи микроплоче су претходно обележени тримеризованим Spike протеином у које се затим додају узорци плазме и контроле. Овде се изврши реакција везивања за имобилизовани Spike протеин. Бунари се перу и додају се IgG антитела коњугована са HRP-ом и везују се за сва заробљена антитела. Бунари се перу и додаје се раствор супстрата који реагује са комплексом ензима да би произвео мерљив сигнал. Интензитет овог сигнала је директно пропорционалан концентрацији антитела присутног у оригиналном узорку. Према протоколу овог стандардног Human SARS-COV-2 Spike (Trimer) IgM ELISA Kit најпре смо вршили испирање бунарчића два пута помоћу комерцијалног Wash Buffer-a а затим смо додали 90µL 1X Assay Buffer у све бунарчиће осим оне са празнинама. Додавали смо 10 µL стандарда, контроле или узорка у одговарајуће бунарчиће. Затим смо додали 100 µL 1X Assay Buffer у бунарчиће прекида. Прекрили смо са покровном фолијом и инкубирали 30 минута на 37°C. Аспирирали смо раствор и испирали бунарчиће 3 пута помоћу Wash Buffera. Након тога смо додавали 100µL 1X HRP коњугованог раствора у сваки бунарчић и инкубирали 30 минута на 37°C. Додавали смо 100 µL раствора супстрата у сваки бунарчић до појављивања плаве боје затим инкубирали током 15 мин на собној температури. Након тога је додавано 100 µL Stop раствора у сваки бунарчић и боја прелазила из плаве у жуту. Одмах по настанку жуте боје читаван је резултат на колориметријском микроплејт читачу на 450nm. Квалитативна анализа резултата врши се на основу формуле:

$$\text{однос апсорбције} = \frac{\text{апсорбција узорка}}{\text{апсорбција калибратора}}$$

Ако овај однос износи <1, циљани Ig је одсутан.

- Ако је однос 1–1,3, резултат је интермедијарни.
- Ако је однос >1,3, циљани Ig је присутан
- Поделити апсорпцију Low Control абсорбцијом калибратора као негативну контролу (однос <1).

- Поделити абсорпцију High Control калибратором ради добијања негативне контроле (однос>1,3).

3.5.2.4. Клинички параметри новорођенчета

3.5.2.4.1. Апгар скор

Апгар скор представља брз, једноставан и јефтин метод за процену стања новорођенчета на рођењу и процену евентуалне потребе за реанимацијом. Давне 1952. године докторка Вирџинија Апгар је осмислила овај метод који је прихваћен широм света у процени иницијалне потребе са интервенцијом, врстом интервенције коју је неопходно извршити или тренутка када је започети. (161,162)

Елементи који сачињавају Апгар скор су: боја коже, срчана акција, рефлекс, тонус мишића и респирације. Сваки од елемената је може имати вредности 0, 1 или 2. Код свих новорођенчади процењује се у 1. и 5 минути живота, а код новорођенчади са скором ≤ 7 и код оних који захтевају реанимацију-на сваких 5 мин. Ови елементи су веома важни како би се проценио компромитован хемодинамски статус новорођенчета који укључује цијанозу, брадикардију, хиперперфузију, хипотонију, респираторну депресију или апнеју.

Табела 2: Елементи за процену Апгар скор

Број бодова	0	1	2
боја коже	бледа	тело ружичасто екстремитети плави	ружичаста
срчана радња	одсутна	<100/мин	>100/мин
дисање	одсутно	споро или неправилно	слаб плач
мишићни тонус	без покрета, млитаво новорођенче	оскудни покретни, савијени екстремитети	спонтани активни покрети
одговор на стимулацију	без одговора	гримаса	кијање, кашљање, одгуривање

На вредност Апгар скор утицај могу имати гестацијска старост и телесна маса новорођенчета, болести мајке, лекови које мајка узима или злоупотреба наркотика као и врста анестезије на порођају. (163)

3.5.2.4.2. Телесна маса и телесна висина на рођењу

Телесна маса новорођенчета представља важан предиктор предиспозиције новорођенчета за обољевање у детињству и у вези је са инхибираним растом и когнитивним развојем као и хроничним болестима у животу. (164)

3.5.2.4.3. Дужина хоспитализације на одељењу неонатологије, боравак на одељењу интензивне неге неонатологије

За свако новорођенче документована је дужина боравка на одељењу неонатологије и евентуалне компликације у раном неонаталном периоду, дијагнозе и исход.

3.6. Снага студије и величина узорка

Прорачун студијског узорка је сачињен на основу података публиковане литературе о учесталости феталне васкуларне малперфузије (FVM) у постељицама трудница које су имале COVID-19 у односу на контролну групу здравих трудница. (119,165) Учесталост FVM код оболелих трудница је била од 6.7-48.3%, док је код здравих трудница она била од 8-11.3%. На основу претпостављене учесталости и очекиване разлике између студијских група за вредности алфа грешке од 0,05, снаге студије 0.8 и односа 1:1 испитаница између група, коришћењем одговарајућег рачунарског програма, за Фишеров егзактни тест дихотомног обележја независних група, израчунат је узорак од 19 испитаница за сваку студијску групу, односно укупно најмање 38 испитаница.

3.7. Статистичка обрада података

У статистичкој обради података коришћени су параметри дескриптивне статистике: фреквенције, проценти, средња вредност, медијана, стандардна девијација (SD) и распон. Статистичка значајност нумеричких варијабли одређена је Студент-овим Т тестом или Ман-Витнијевим тестом у зависности од типа расподеле података. За анализу категоријских променљивих у односу на групу пацијенткиња примењен је хи-квадрат тест за независност. За анализу нумеричких променљивих у односу на триместар коришћен је Крускал-Волисов тест. Статистички тестови (нпр. корелација) коришћени су сходно резултатима основне, експлоративне анализе. Коришћењем Спирмановог коефицијента корелације, испитиван је утицај испитиваних независних варијабли на студијске исходе. За анализу нумеричких променљивих у односу на гестацијску недељу примењен је метод корелације и регресије, односно тумачена је вредност Спирмановог коефицијента корелације а статистичка значајност вероватноћа испитиваних разлика у вредностима варијабли између студијских група претпостављена је за $p < 0.05$. Сви статистички прорачуни изведени су употребом стандардног програмског пакета SPSS v 20.0.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Клиничке карактеристике пацијенткиња оболелих од COVID-19 у односу на контролну групу

Наша студија обухватила је 50 трудница подељених у две групе, SARS-COV-2 позитивне (COVID-19 група) и SARS-COV-2 негативне (контролна група).

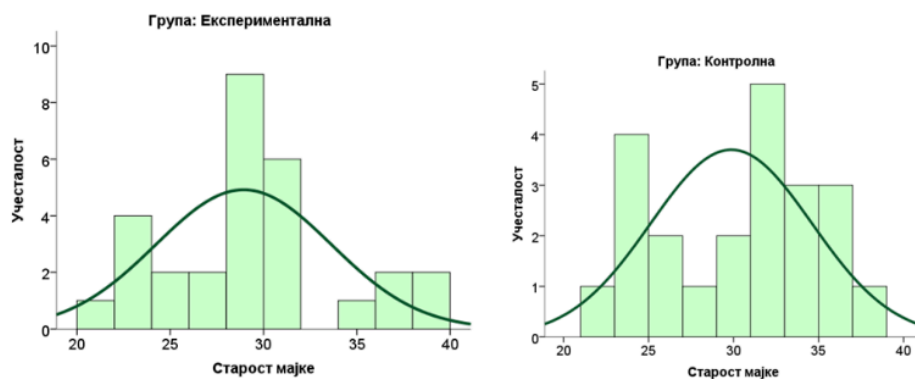
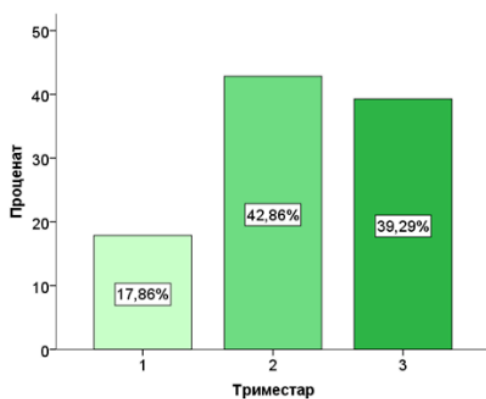


График 1: а-старост мајке у SARS-COV-2 групи, б-старост мајке у Контролној групи

У првој групи, просечна старост испитаница је била $30,61 \pm 4,72$, а у контролној групи, просечна старост је била $31,41 \pm 4,65$. (График 1)



Од укупног броја испитаница током првог триместра је било заражено 17.86% трудница, током другог 42,86% а током трећег 39.29%. (График 2)

График 2: Проценат заражених трудница у односу на триместар трудноће када се десила инфекција

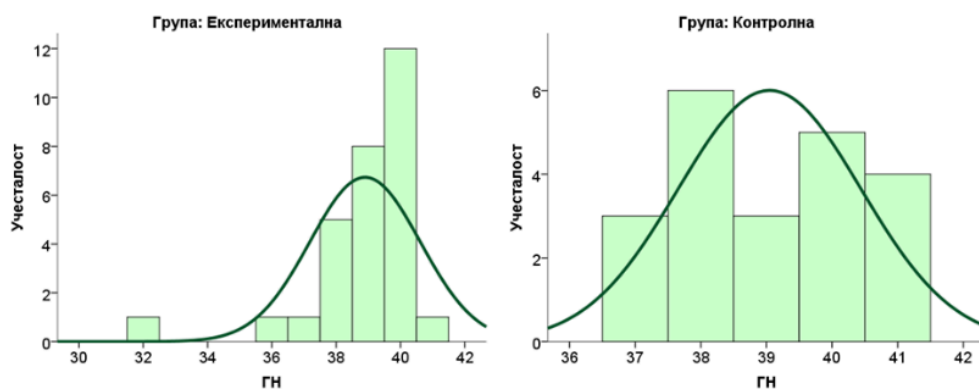
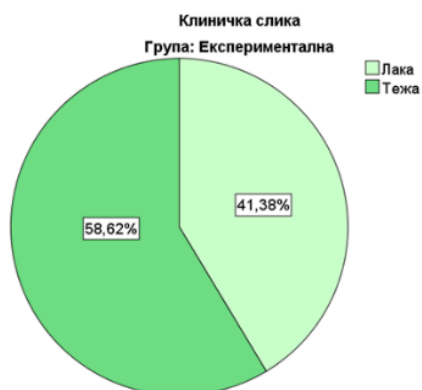


График 3: 3а-Трајање трудноће у SARS-COV-2+ групи, 3б-Трајање трудноће у контролној групи

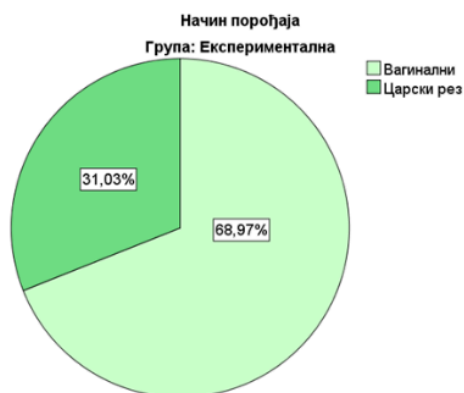
Средња вредност дужине трајања трудноће била је $39,19 \pm 0,98$ гн у COVID-19 групи а $39,42 \pm 1,26$ гн у контролној групи. (График 3)



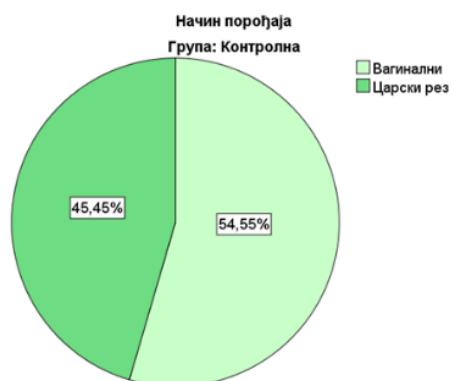
На основу тежине симптома, 41,38% пацијенткиња је имало благе симптоме, а 58,62% је имало изражене и тешке симптоме COVID-19. Унутар групе пацијенткиња са израженим и тешким симптомима COVIDa-19 пацијенткиње су развиле клиничку слику пнеумоније и зависиле су од кисеоничке терапије. (График 4)

График 4: Расподела пацијенткиња према тежини клиничке слике

Порођај је завршен вагиналним путем у 69% испитаница, а царским резом у 31% случајева унутар SARS-COV-2+ групе, наспрот 45% вагинално завршених и 55% царских резова у контролној групи. (График 5)

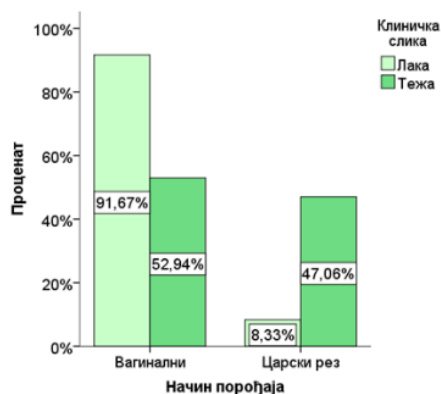


5а



5б

График 5: Расподела пацијенткиња према начину завршавања порођаја: 5а-начин завршавања трудноће у SARS-COV-2+ групи, 5б-начин завршавања порођаја у контролној групи.



У групи пацијенткиња са тешком клиничком сликом оперативни начин завршавања порођаја био је изражено заступљенији него у групи са лаким клиничком сликом 47,6% према 8,33%, што закључујемо помоћу статистичке анализе спроведене путем Хи квадрат теста ($p=0,026$) (График 6)

График 6: Начин порођаја у односу на клиничку слику пацијенткиња заражених SARS-COV-2

4.2 Перинаталне карактеристике новорођенчади мајки инфицираних SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу

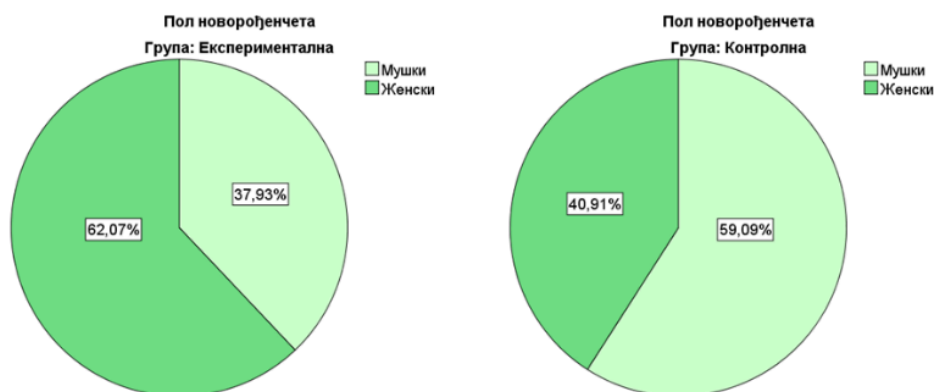


График 7: Расподела новорођенчади SARS-COV-2 и контролне групе према полу

У групи SARS-COV-2+ 62% новорођенчади биле су девојчице, 38% дечаци, а у контролној групи 41% девојчице и 59% дечаци. (График 7)

Параметри новорођенчета који одређују перинатални исход као што су телесна дужина плода, телесна тежина плода, обим главе, тежина постељице, апгар скор новорођенчета у првом и петом минути живота и дебљина пресека пупчаника нису показивали значајне разлике међу групама (Табела 3). Новорођенчад мајки из SARS-COV-2 групе имала су сличну средњу дужину хоспитализације - $4,46 \pm 1,35$ дана, као и новорођенчад из контролне групе са средњом дужином хоспитализације од $4,23 \pm 2,72$ дана (табела 3). Студентовим Т тестом израчунали смо да нема статистички значајне разлике у дужини хоспитализације новорођенчади ($p=0.34$) (табела 4).

Два параметра неонаталног исхода показали су значајне разлике међу групама- боравак на одељењу интензивне неге новорођенчади и концентрација SARS-COV-2 IgM At у крви новорођенчета у првом дану живота. (табела 4, график 8).

Табела 3. Средње вредности параметара који се односе на новорођенче на рођењу према присуству инфекције SARS-COV-2 мајке. Резултати су представљени као средња вредност плус стандардне девијације.

Променљива	Експериментална група		Контролна група	
	Мин-Макс	Просек±СД	Мин-Макс	Просек±СД
Старост мајке	21-39	28,93±4,70	22-37	29,86±4,74
АПГАР скор 1мин	7-10	9,07±0,65	6-10	9,14±0,94
АПГАР скор 5мин	9-10	9,24±0,44	7-10	9,05±0,78
Телесна маса	2000-4150	3402±462	2720-4350	3484±437
Телесна дужина	44-52	49,10±2,19	46-55	50,00±2,27
ОГ	30-37	34,52±1,50	33-38	35,23±1,48
ГН	32-41	38,90±1,72	37-41	39,05±1,40
Маса постељице	260-1000	605,17±153,78	450-900	617,73±128,65
Однос маса постељица / дете	3,88-13,65	6,01±2,06	3,54-7,47	5,82±1,14
Пупчаник	8-15	11,96±2,25	10-20	13,41±2,63
Дужина хоспитализације детета	2-7	4,46±1,35	2-15	4,23±2,72
Боравак на интензивној нези	0-7	3,51±1,04	0-8	2,23±1,39
Вредност ИгМ	0,07-9,25	2,27±2,92	0,10-1,02	0,29±0,26

Табела 4: Статистичка обрада података добијена је коришћењем студентовог Т-теста

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
Старост мајке	0,699	49	0,488
APGAR Score/1min	0,788	-	0,431
APGAR Score/5min	0,780	-	0,435
Телесна маса	0,636	49	0,528
Телесна дужина	1,088	-	0,277
ОГ	1,683	49	0,099
ГН	0,081	-	0,935
Маса постељице	0,309	49	0,758
Однос тежине постељице и масе детета	0,685	-	0,494
Пупчаник	1,837	-	0,066
Дужина хоспитализације детета	0,944	-	0,345
Боравак на интензивној нези	2,059	-	0,039
Вредност ИгМ	2,018	-	0,044

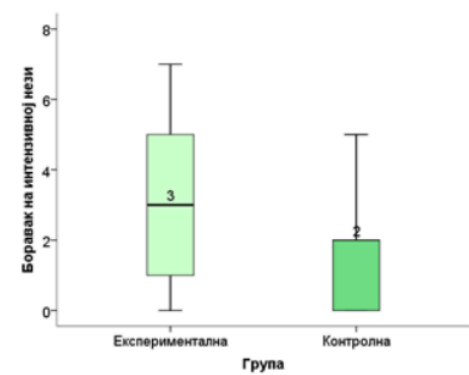
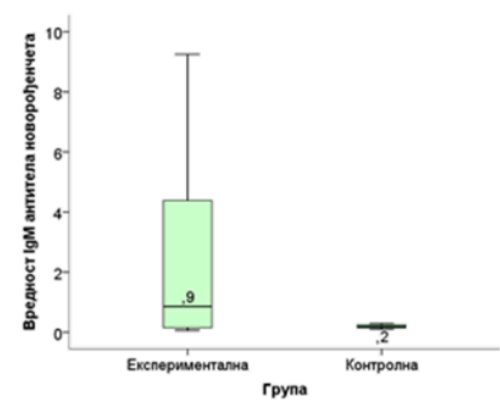


График 8: Дужина боравка на интензивној нези према присуству SARS-COV-2 инфекције мајке $p=0.038$



Код новорођенчади мајки SARS-COV-2+ групе уочена је значајно разлика у нивоу SARS-COV-2 IgM антитела у односу на контролну групу. ($p=0.044$) (График 9)

График 9: Вредност IgM SARS-COV-2 At у односу на SARS-COV-2 инфекције мајке

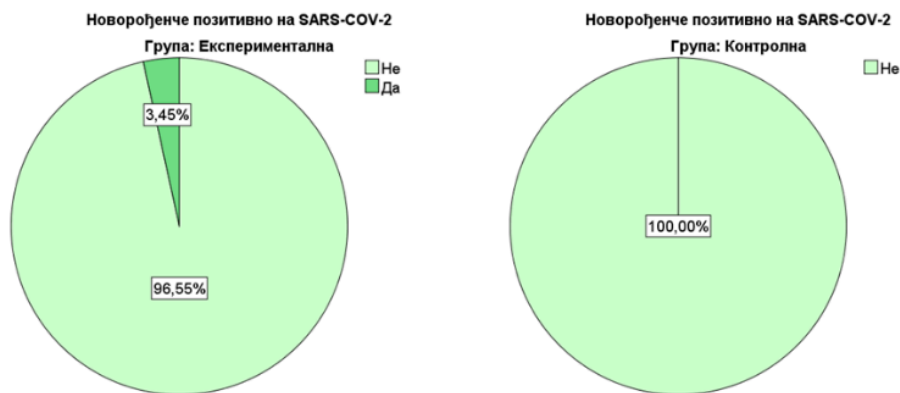


График 10: 10а- Налаз SARS-COV-2 PCR теста код новорођенчади у зависности од инфекције мајке у SARS-COV-2+ групи, 10б- Налаз SARS-COV-2 PCR теста код новорођенчади у зависности од инфекције мајке у контролној групи

Табела 5: Разлика учесталости одређених параметара перинаталног исхода међу групама статистички обрађена

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
Меконијалне овојнице	1,552	1	0,213
Меконијална вода	0,791	1	0,374
Позитивност детета	0,774	1	0,379
Пол новорођенчета	2,248	1	0,134
Начин порођаја	1,113	1	0,291

Статистички није било значајне разлике у броју SARS-COV-2 позитивно тестиране новорођенчади међу групама, ($p=0.37$) (график 10), у начину завршавања порођаја ($p=0.29$), у полу новорођенчади ($p=0.134$), као ни у меконијалним овојницама и меконијалној плодовој води међу групама ($p=0.21$ и $p=0.37$). (табела 5)

Анализирајући параметре перинаталног исхода код подгрупа SARS-COV-2+ пацијенткиња у односу на тежину клиничке слике мајке добили смо статистички значајну разлику у односу на дужину хоспитализације новорођенчета и боравака новорођенчета на одељењу интензивне неонаталне неге ($p=0.01$ и $p=0.004$). (График 11)

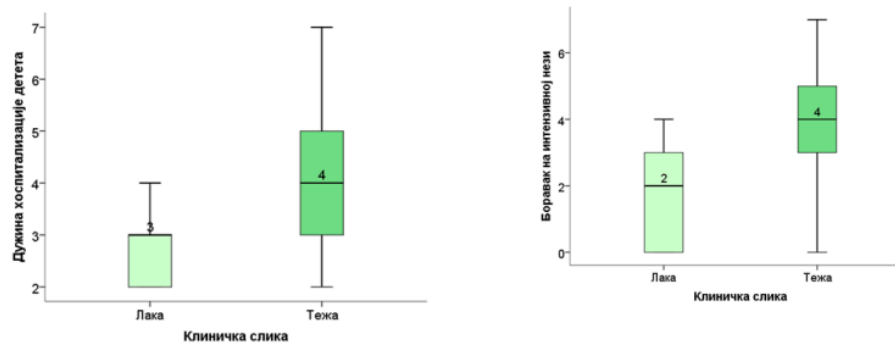


График 11: *11a*-Дужина хоспитализације новорођенчета о односу на клиничку слику мајке заражене SARS-COV-2 вирусом, *11б*-боравак на одељењу интензивне неге новорођенчади мајки заражених SARS-COV-2 у односу на клиничку слику.

Табела 6: Статистичка анализа вредности параметара који се односе на новорођенче на рођењу према тежини инфекције SARS-COV-2 мајке. Коришћен студентов *t* тест за ниво значајности $p=0,05$

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
Старост мајке	0,535	1	0,593
APGAR Score/1min	1,250	1	0,211
APGAR Score/5min	1,821	1	0,069
Телесна маса	0,620	1	0,535
Телесна дужина	0,587	1	0,557
ОГ	1,866	1	0,062
ГН	0,210	1	0,834
Маса постељице	0,379	1	0,705
Однос тежине постељице и масе детета	0,266	1	0,790
Пупчаник	0,365	1	0,715
Дужина хоспитализације детета	2,588	1	0,010
Боравак на интензивној нези	2,917	1	0,004
Број дана пре порођаја	0,400	1	0,689
Вредност ИгМ	1,904	1	0,057
Гестацијска недеља	0,044	1	0,965

Код новорођенчади мајки са тежом клиничком сликом COVID-19 значајно је била дужа дужина хоспитализације новорођенчета и боравак на интензивној нези новорођенчади у односу на групу новорођенчади мајки са лакшом клиничком сликом. ($p=0,01$ и $p=0,004$)

4.3. Анализа нивоа оксидативног стреса према присуству инфекције SARS-COV-2 мајке

Према присуству инфекције SARS-COV-2, средње вредности параметара оксидативног стреса приказане су у облику графика 12а-12г а редокс статуса помоћу графика 13а-13в. Вредности радикала супероксидног аниона, водоник пероксида и индекса липидне пероксидације биле су значајно различите код мајки у зависности од присуства инфекције SARS-COV-2, док су нивои нитрита, индекса липидне пероксидације, редукованог глутатиона и супероксид дизмутазе били значајно различити код новорођенчади у зависности од инфекције SARS-COV-2 мајке. Остали параметри оксидативног стреса и редокс статуса нису показивали статистички значајну разлику међу групама (График 12 и 13, Табела 7).

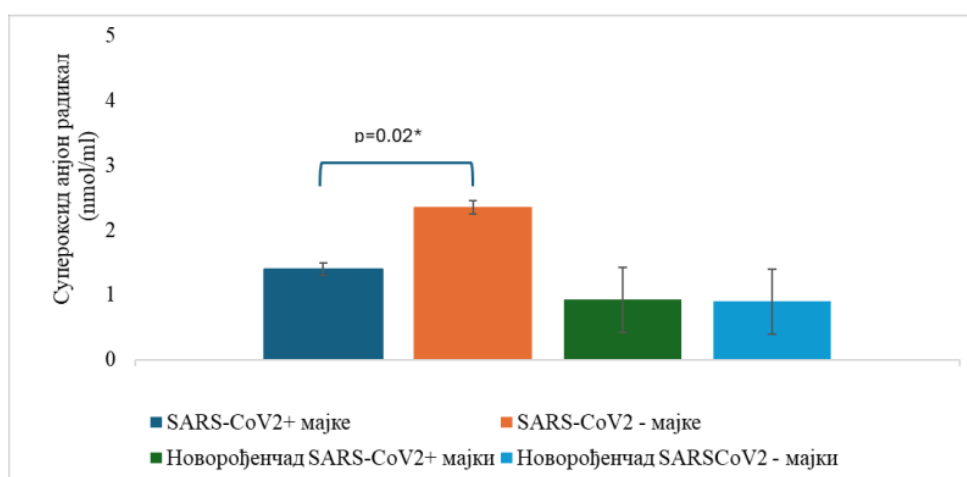


График 12а. Средња концентрација радикала супероксида аниона у плазми (O_2^-). Резултати су представљени као аритметичка средина плус стандардне девијације. Статистичка анализа је урађена коришћењем Студентовог Т-теста.

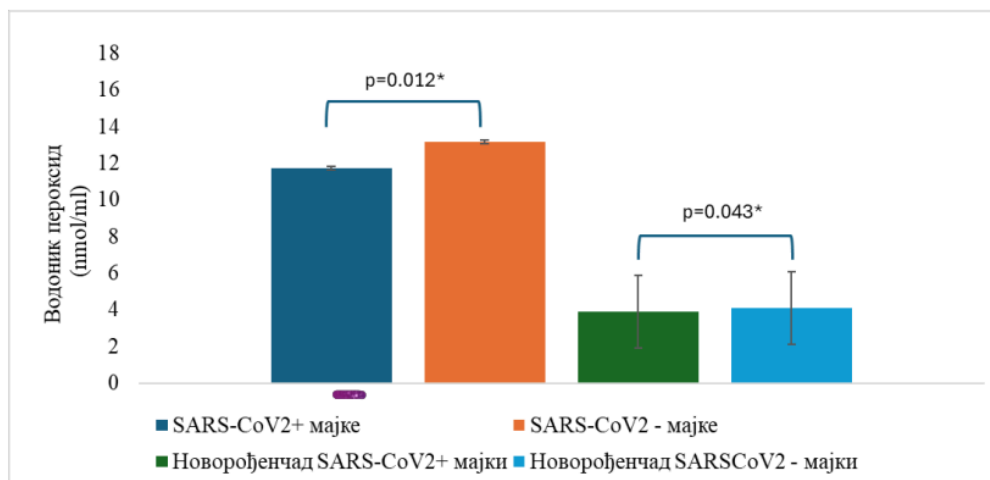


График. 12б Средња концентрација водоник пероксида у плазми (H_2O_2). Резултати су представљени као аритметичка средина плус стандардне девијације. Статистичка анализа је урађена коришћењем Студентовог Т-теста.

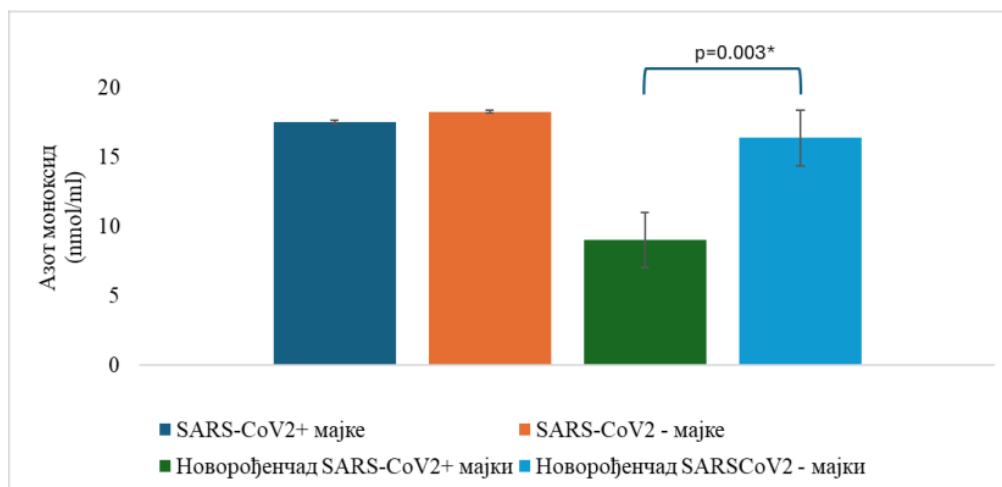


График 12в. Средња концентрација нитрита у плазми (NO_2^-). Резултати су представљени као аритметичка средина плус стандардне девијације. Статистичка анализа је урађена коришћењем Студентовог Т-теста.

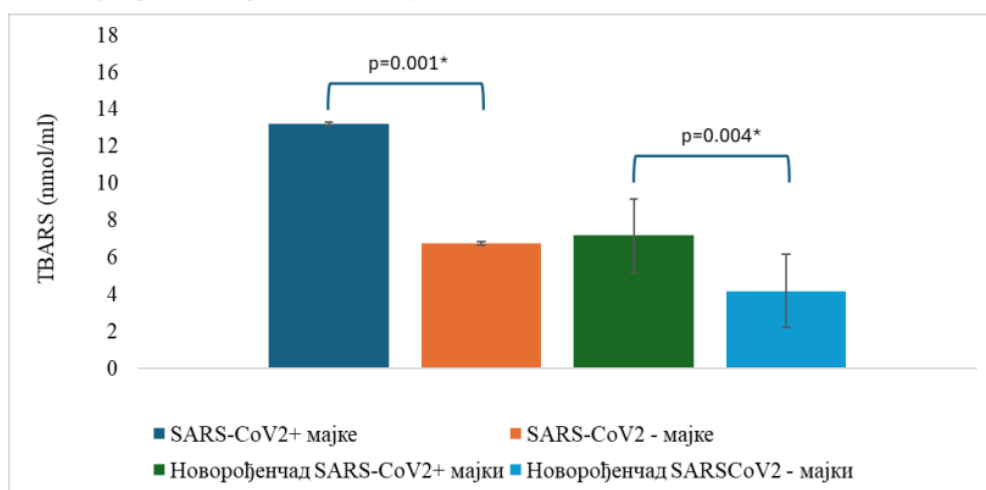


График 12г. Средња концентрација индекса липидне пероксидације у плазми (TBARS). Резултати су представљени као аритметичка средина плус стандардне девијације. Статистичка анализа је урађена коришћењем Студентовог Т теста.

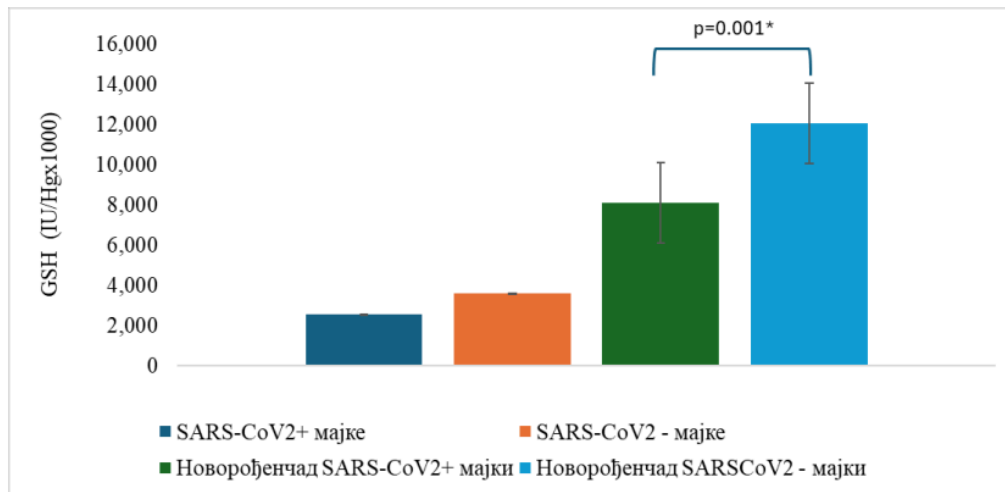


График 13а. Средња активност редукованог глутатиона (GSH). Резултати су представљени као аритметичка средина плус стандардне девијације. Статистичка анализа је урађена коришћењем Студентовог Т-теста.

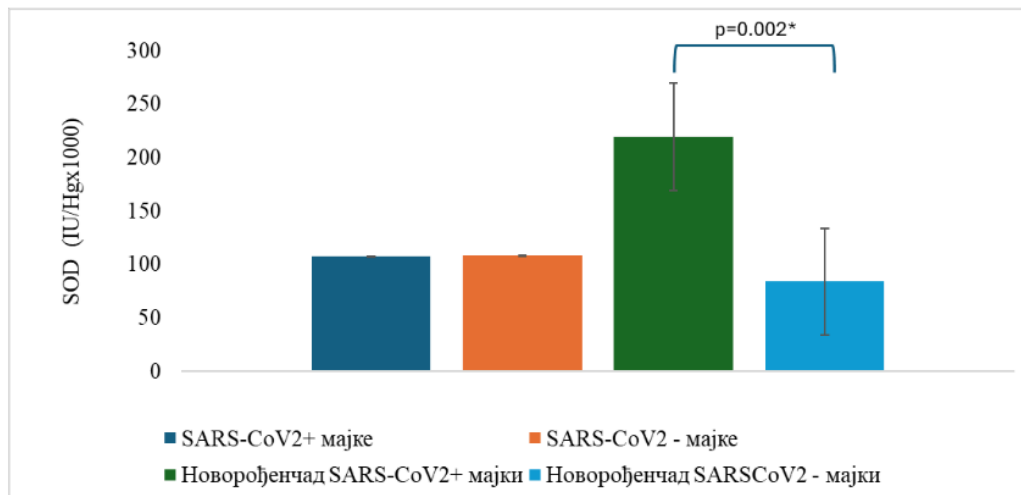


График 13б. Средња активност унутар хемолизата супероксид дисмутазе (SOD). Резултати су представљени као аритметичка средина плус стандардне девијације. Статистичка анализа је урађена коришћењем Студентовог Т-теста.

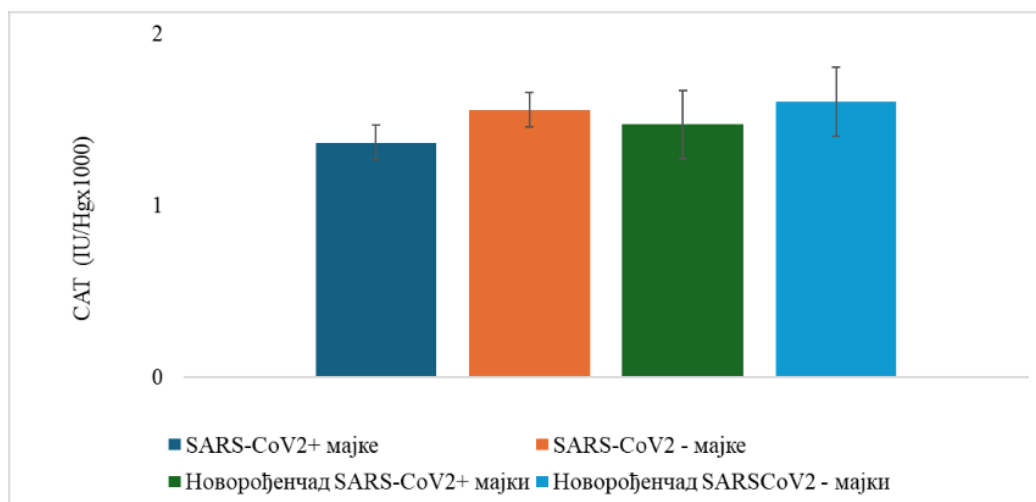


График 13в. Средња активност каталазе унутар хемолизата (CAT). Резултати су представљени као средња плус стандардне девијације. Статистичка анализа је урађена коришћењем Студентовог T-теста.

Табела 7. Резултати статистичке анализе обављене Студентовим t тестом ради поређења концентрација биомаркера оксидативног стреса између SARS-COV2 + и SARS-COV2 – групе мајки и новорођенчади

Поређења	Мајке	Новорођенчад
	SARS-COV2 + ca SARS-COV2 -	SARS -COV2 + ca SARS-COV2 -
O_2^-	p=0.002*	p=0.113
H_2O_2	p=0.012	p=0.043*
NO_2^-	p=0.509	p=0.003*
TBARS	p=0.001*	p=0.004*
GSH	p=0.322	p=0.001*
SOD	p=0.488	p=0.002*
CAT	p=0.566	p=0.623

4.3.1. Анализа нивоа биомаркера оксидативног стреса унутар SARS-COV-2+ групе пацијенткиња према триместру у коме се одиграла инфекција

Табела 8: Статистичка анализа разлике средњих вредности биомаркера оксидативног стреса унутар групе SARS-COV-2+ пацијенткиња у односу на триместар у коме се одиграла инфекција изражена помоћу Хи-квадрат теста

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
O2-M	0,703	2	0,704
O2-P	1,183	2	0,553
H2O2-M	1,182	2	0,554
H2O2-P	0,824	2	0,662
NO-M	1,789	2	0,409
NO-P	0,196	2	0,907
TBARS-M	1,654	2	0,437
TBARS-P	1,183	2	0,554
GSH-M	2,152	2	0,341
GSH-P	0,892	2	0,640
SOD-M	0,559	2	0,756
SOD-P	0,248	2	0,883
CAT-M	2,171	2	0,338
CAT-P	1,156	2	0,561

Анализом добијених података уочавамо да није било статистички значајне разлике у нивоу биомаркера оксидативног стреса за ниво значајности $p < 0,05$ (табела 8).

4.3.2. Анализа нивоа биомаркера оксидативног стреса унутар SARS-COV-2+ групе пацијенткиња према тежини клиничке слике мајке

Табела 9: Статистичка анализа разлике средњих вредности биомаркера оксидативног стреса унутар групе SARS-COV-2+ пацијенткиња у односу на тежину клиничке слике мајке изражена помоћу Wilcoxonovog теста ($p < 0.05$)

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
O2-M	0,242	1	0,809
O2-P	0,546	1	0,585
H2O2-M	0,448	1	0,654
H2O2-P	0,949	1	0,343
NO-M	2,214	1	0,027
NO-P	0,949	1	0,343
TBARS-M	1,634	1	0,102
TBARS-P	0,580	1	0,562
GSH-M	0,105	1	0,916
GSH-P	0,132	1	0,895
SOD-M	0,687	1	0,492
SOD-P	1,583	1	0,113
CAT-M	0,220	1	0,826
CAT-P	1,268	1	0,205

Резултат анализе говори у прилог томе да је вредност NO значајно повишена код мајки са израженом клиничком сликом у односу на подгрупу са лако клиничком сликом COVID-19. (табела 9)

4.4. Заступљеност хистопатолошких лезија у плаценти у вези са присуством инфекције SARS-COV-2 мајке

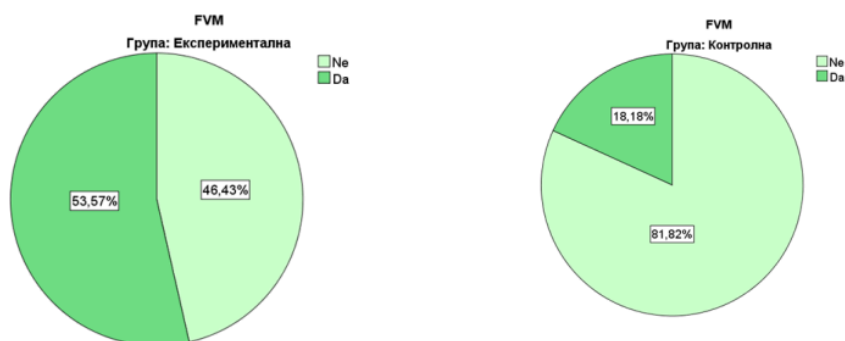


График 14: Заступљеност патохистолошких промена типа FVM постепљичног ткива у SARS-COV-2+ групи и контролној групи

Учесталост патохистолошких промена типа FVM у SARS-COV-2+ групи трудница износила је 46%, док су у контролној групи FVM биле заступљене у 18% укупног броја испитаних плаценти, док је учесталост MVM у SARS-COV2+ групи била је 32%, а у SARS-COV2- групи 18% (График 14,15). Инфламаторне лезије у плацентном ткиву откривене су у 14,81% испитаница у SARS-COV-2+ групи, према 4,5% постепљича код испитаница контролне групе. (табела 10)

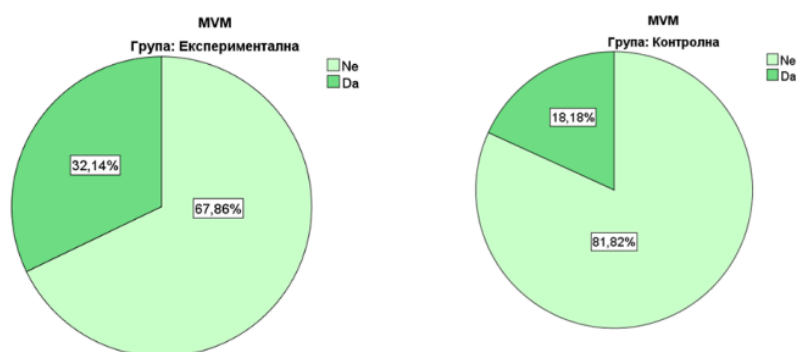


График 16: Заступљеност патохистолошких промена типа MVM унутар постепљичног ткива у SARS-COV-2+ групи и контролној групи

Табела 10. Морфометријске плацентне карактеристике мајки у односу на присуство COVID-19. Резултати су приказани као учесталост посматраног ентитета у процентима (%).

Карактеристике	SARS-COV-2+ група	SARS-COV-2- група
тромбоза	+	+
	[6/28]	[1/22]
	[21.4%]	[4.54%]
аваскуларне ресице	++	+
	[9/28]	[1/22]
	[32.1%]	[4.54%]
депозити фибрина	+	-
	[1/28]	[0/22]
	[3.57%]	[0%]
вилозна стромална васкуларна кариорексија	-	-
	[0/28]	[0/22]
	[0%]	[0%]
облитерација крвних судова	+++	+
	[12/28]	[1/22]
	[42.8%]	[4.54%]
васкуларна ектазија	++	-
	[8/28]	[0/22]
	[28.5%]	[0%]
одложено сазревање вилуса	-	+
	[0/28]	[1/22]
	[0%]	[4.54%]
инфаркт плаценте	+	-
	[3/28]	[0/22]
	[10.7%]	[0%]
ретроплацентално крварење	++	-
	[7/28]	[0/22]
	[25%]	[0%]

хипоплазија дисталних ресица	+ [2/28 [7.14%]	- [0/22] [0%]
убрзано сазревање вилуса	++ [8/28] [28.5%]	++ [4/22] [18.1%]
децидуална артериопатија	- [0/28] [0%]	- [0/22] [0%]
инфламаторне промене	+ [4/28] [14.3%]	- [0/22] [0%]

+ означава присуство ентитета у 10%

+ + означава присуство ентитета у 25%

+ + + означава присуство ентитета у 40% и више

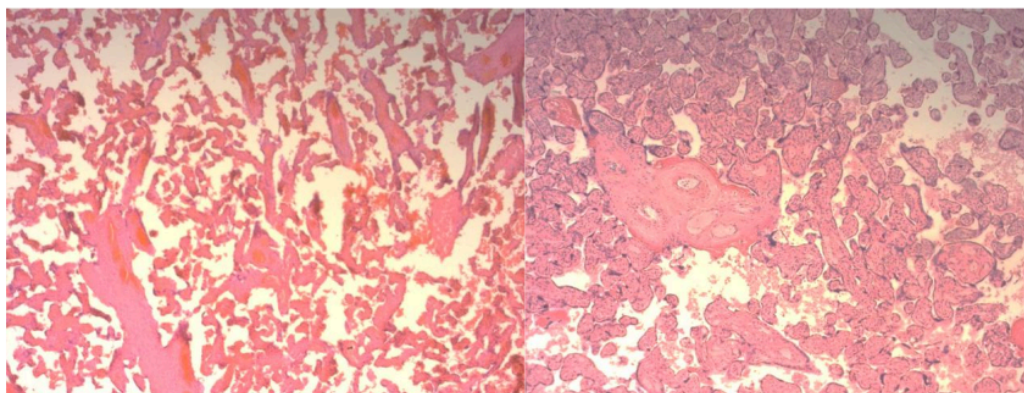
За анализу категоријских променљивих у односу на групу пацијенткиња примењен је хи-квадрат тест за независност а за графички приказ статистички значајних резултата коришћен је стубичасти кластер графикон.

За анализу нумеричких променљивих у односу на групу пацијенткиња примењен је Ман-Витнијев тест, а за графички приказ статистички значајних резултата коришћен је кутијаста (правоугаони) графикон.

Табела 11: Приказани су резултати статистичке анализе заступљености патолошких налаза плацентних лезија. Статистичка анализа обављена је помоћу Хи-квадрат теста. ($p < 0,05$)

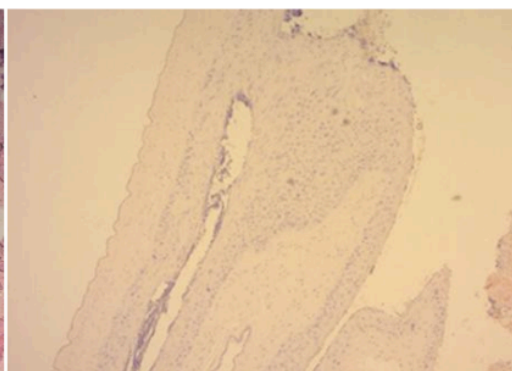
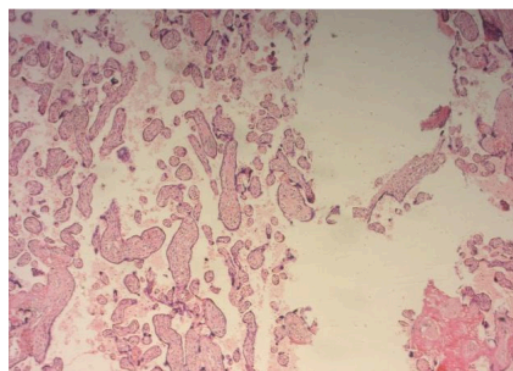
	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
Тромбоза	3,093	1	0,079
Аваскуларне ресице	5,864	1	0,015
Интрамурални фибрински депозити	0,832	1	0,362
Облитерација крвних судова	6,968	1	0,008
Васкуларна ектазија	6,395	1	0,011
Одложена матурација вилуса	1,299	1	0,254
Плацентарна хипоплазија	2,508	1	0,113
Хипоплазија дисталних вилуса	1,564	1	0,211
Убрзана вилусна матурација	1,407	1	0,236
Децидуална артериопатија	0,794	1	0,373
ФВМ	6,549	1	0,010
МВМ	1,248	1	0,264

Из приказаног (табеле 11) може се уочити да постоји значајна статистичка разлика у заступљености FVM код SARS-COV-2 групе у односу на контролну групу ($p=0.01$). У односу на специфичне ентитете постоји статистички значајна уочена разлика у заступљености васкуларних ектазија, облитерацији крвних судова и аваскуларним ресицама између ове две групе пацијенткиња ($p=0,01$, $p=0,008$, $p=0,015$).



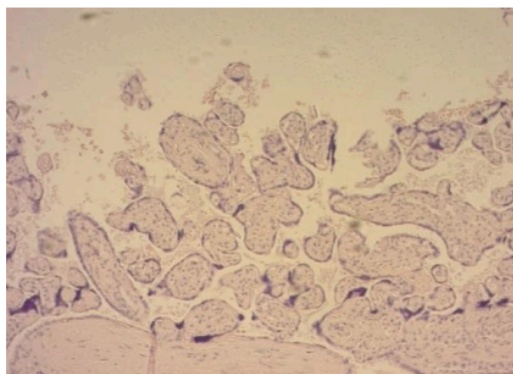
4а

4б



4г

4в



4д

4ж

Слика 4: Репрезентативни патохистолошки налази у узорцима плацентног ткива међу студијском популацијом; **4а**-приказана хипоплазија дисталних вилуса - дуге ресице са широким интервиллозним простором, увећање 50х; **4б**-приказана васкуларна ектазија - увећани луминални пречник хорионског суда, увећање 50х; **4в**-Дистална

вилозна хипоплазија, увећање 50х 4г-приказан хориоамнионитис-бројни полиморфонуклеарни леукоцити инфилтрицију едематозне феталне мембране, увећање 50х; 4д-Приказани аваскуларнежи вилуси-губитак крвних судова са очувањем трофобласта, увећање 50х; 4ђ-приказана вилусна тромбоза -организовани интралуминални тромб

4.4.1. Заступљеност хистопатолошких лезија у плаценти унутар SARS-COV-2 групе трудница у односу на триместар у коме се догодила инфекција

Табела 12: Статистичка анализа обављена помоћу хи квадрат теста - разлике између заступљености патохистолошких ентитета унутар SARS-COV-2+ групе трудница у односу на триместар у коме се догодила инфекција

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
Тромбоза	1,832	2	0,400
Аваскуларне ресице	3,187	2	0,203
Интрамурални фибрински депозити	4,569	2	0,102
Облитерација крвних судова	3,451	2	0,178
Васкуларна ектазија	0,097	2	0,953
Плацентарна хипоплазија	1,312	2	0,519
Хипоплазија дисталних вилуса	2,872	2	0,238
Убрзана вилусна матурација	3,017	2	0,221
Децидуална артериопатија	1,298	2	0,523
ФВМ	0,149	2	0,928
МВМ	2,957	2	0,228

Међу подгрупама SARS-COV-2+ групе трудница формираним у односу на триместар у коме се догодила инфекција није било значајних статистичких разлика у учесталости испољавања патохистолошких лезија постељице.(табела 12)

4.4.2. Заступљеност хистопатолошких лезија у плаценти унутар SARS-COV-2+ групе трудница у односу на тежину клиничке слике мајке

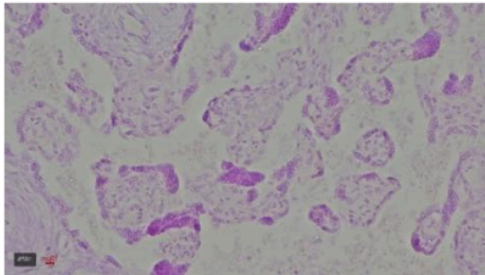
Табела 13: Статистичка анализа разлике између заступљености патохистолошких ентитета унутар SARS-COV-2 групе трудница у односу на тежину клиничке слике мајке. Анализа је обављена помоћу Хи квадрат теста ($p < 0,05$)

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
Тромбоза	1,832	2	0,400
Аваскуларне ресице	3,187	2	0,203
Интрамурални фибрински депозити	4,569	2	0,102
Облитерација крвних судова	3,451	2	0,178
Васкуларна ектазија	0,097	2	0,953
Плацентарна хипоплазија	1,312	2	0,519
Хипоплазија дисталних вилуса	2,872	2	0,238
Убрзана вилусна матурација	3,017	2	0,221
Децидуална артериопатија	1,298	2	0,523
ФВМ	0,149	2	0,928
МВМ	2,957	2	0,228

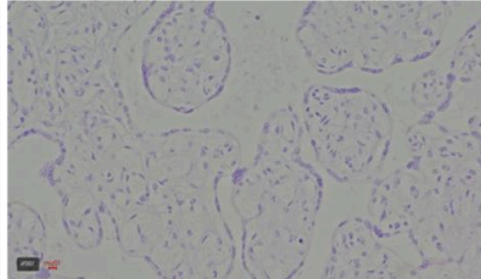
На основу резултата добијених статистичком анализом заступљености патохистолошких промена унутар постелјичног ткива (табела 13) није било статистички значајне разлике међу подгрупама унутар SARS-COV-2+ групе у односу на тежину клиничке слике мајке.

4.5. Имунохистохенијска анализа

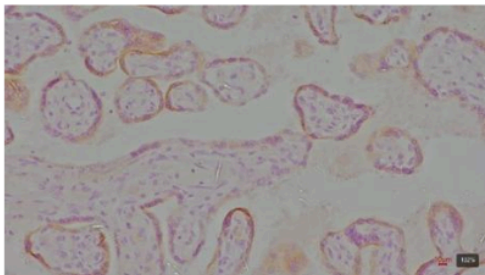
4.5.1. Анализа експресије ACE2 рецептора унутар постељичиног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу



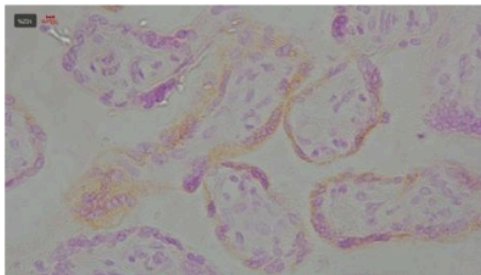
5a



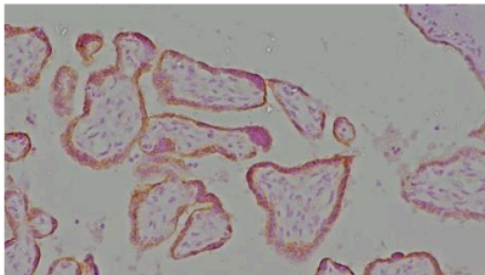
5б



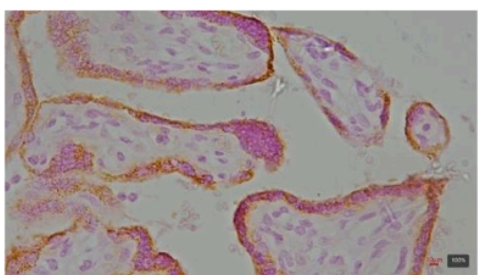
5в



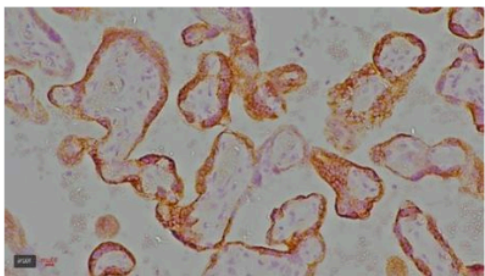
5г



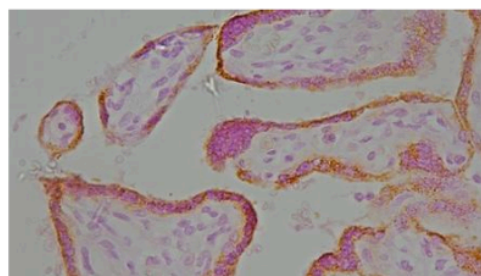
5д



5ђ



5е



5ж

Слика 5: *5a*-ћелије трофобласта не показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност на ACE2 антитело-негативна контрола увећање 200х, **5б**-Негативна контрола увећање 400х, **5в**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност на ACE2 антитело лаког интензитета (светло жута боја)-увећање 200х, **5г**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност на ACE2 антитело лаког интензитета (светло жута боја) увећање 400х, **5д**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност на ACE2 антитело умереног интензитета (светло браон боја) увећање 200х, **5ђ**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност на ACE2 антитело умереног интензитета (светло браон боја) увећање 400х, **5е**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност на ACE2 антитело израженог интензитета (тамно браон боја) увећање 200х, **5ж**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност на ACE2 антитело израженог интензитета (тамно браон боја) увећање 400х.

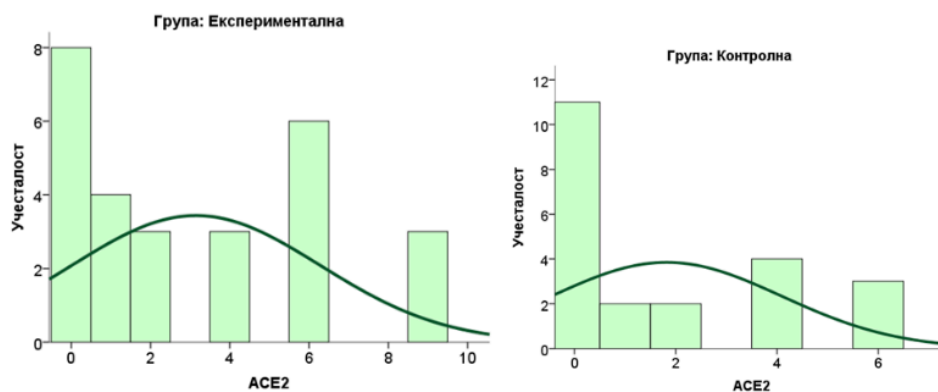
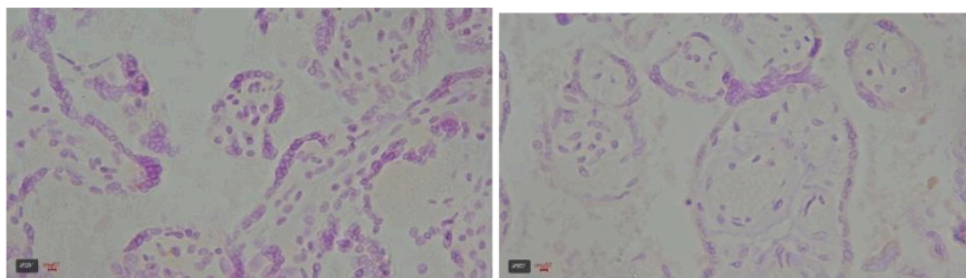


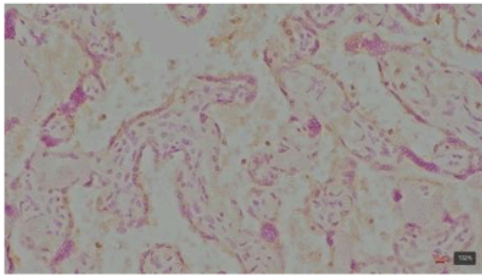
График 17: Учесталост експресије ACE2 рецептора на ћелијама постељичног ткива код пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и у контролној групи

4.5.2. Експресије SPIKE протеина унутар постељичиног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу

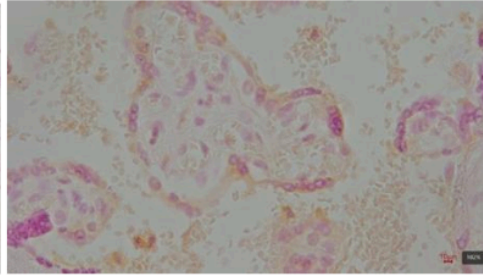


6а

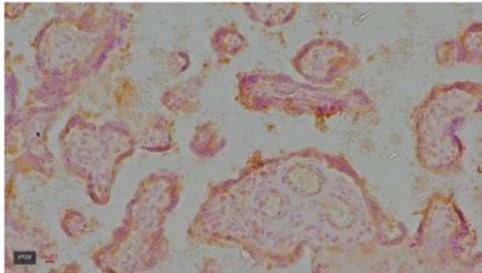
6б



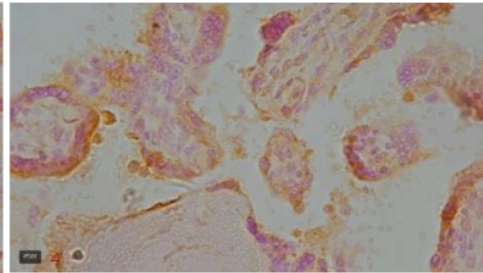
бв



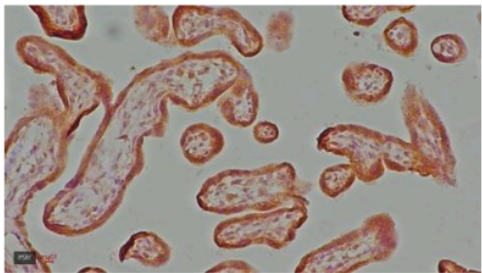
бг



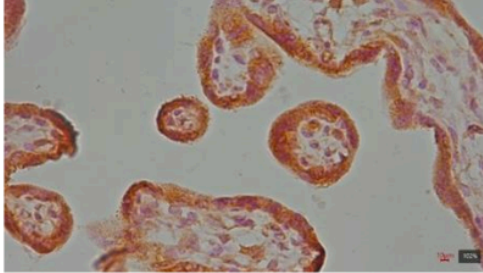
бд



бђ



бе



бж

Слика 6: **ба**-ћелије трофобласта не показују имунореактивност на SARS-COV-2 антитело-негативна контрола увећање 200x; **бб**-негативна контрола увећање 400x; **бв**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност лаког интензитета на SARS-CoV-2 антитело (светло жута боја) 200x; **бг**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност лаког интензитета на SARS-COV-2 антитело (светло жута боја) увећање 400x; **бд**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност умереног интензитета на SARS-COV-2 антитело (светло браон боја) 200x; **бђ**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност умереног интензитета на SARS-COV-2 антитело (светло браон боја)- увећање 400x; **бе**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност израженог интензитета на SARS-COV-2 антитело (тамнобраон боја) увећање 200x; **бж**-ћелије трофобласта показују мембранску и цитоплазматску имунопозитивност израженог интензитета на SARS-COV-2 антитело (тамнобраон боја) увећање 400x.

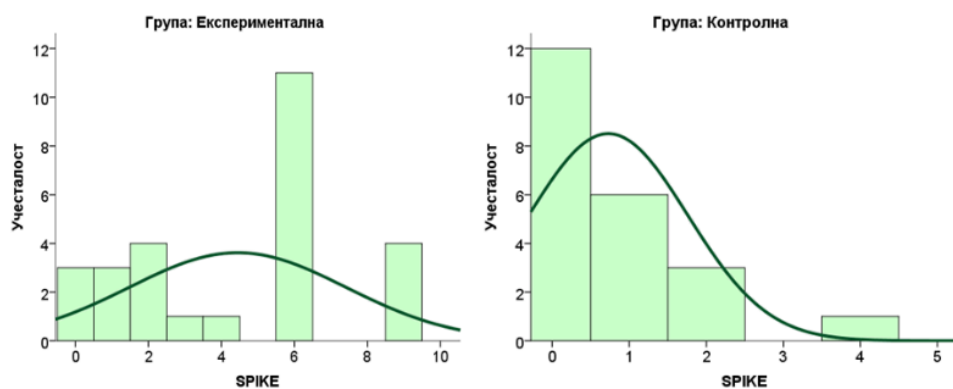


График 18: Учесталост експресије SPIKE протеина унутар постеличног ткива код пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и у контролној групи

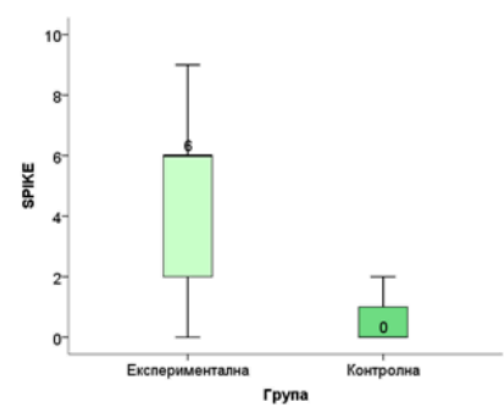
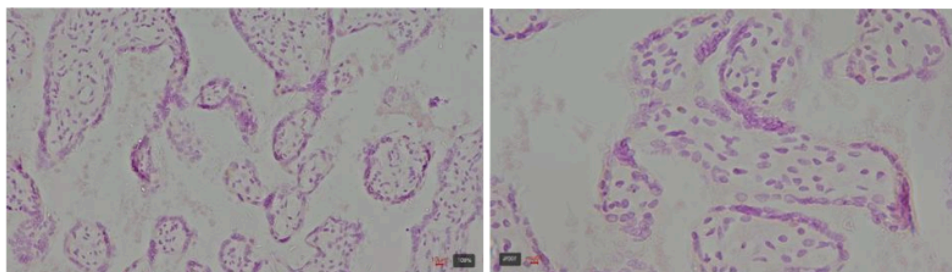


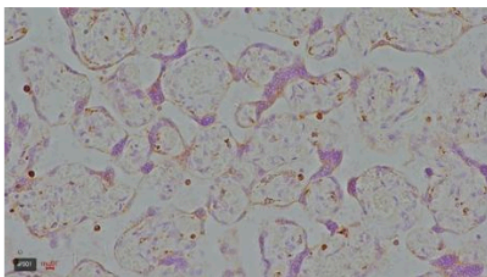
График 19: Расподела учесталости експресије Spike протеина унутар постеличног ткива код пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и у контролној групи

4.5.3. Експресија CD68+ леукоцита унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу

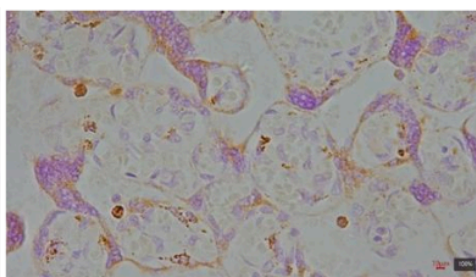


7а

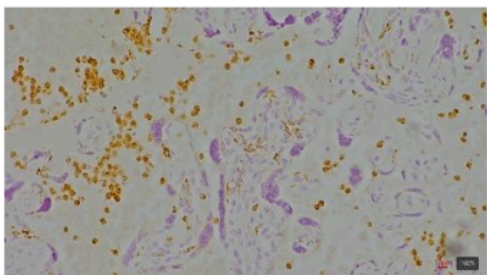
7б



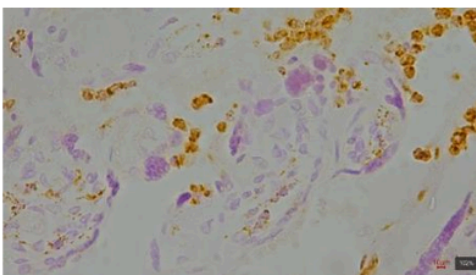
7b



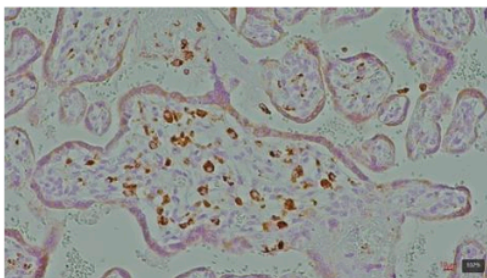
7г



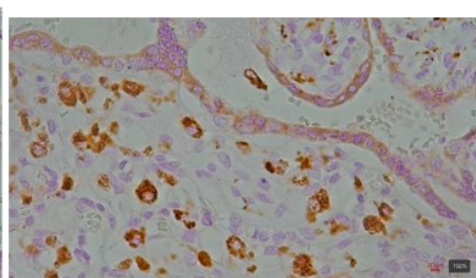
7д



7ђ



7e



7ж

Слика 7: 7a-негативна контрола увећање 200x, 7б-негативна контрола увећање 400x, 7в-у строми и интервилосним просторима присутни ретки CD68 позитивни макрофаги-увећање 200x, 7г-у строми и интервилосним просторима присутни ретки CD68 позитивни макрофаги-увећање 400x, 7д-У интервилосним просторима присутни бројни интензивно CD68 позитивни макрофаги који захватају више од 5 % интервилусног простора-хронични хистиоцитни интервилитис -увећање 200x, 7ђ-хронични хистиоцитни интервилитис-увећање 400x, 7е-У строми вилуса присутни бројни интензивно CD68 позитивни макрофаги-вилосни хистиоцитис -увећање 200x, 7ж-вилосни хистиоцитис увећање 400x.

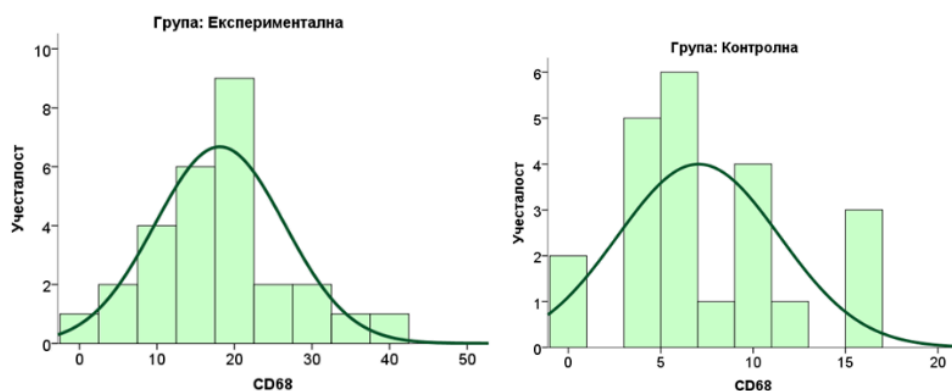


График 20: Учесталост експресије CD68 маркера леукоцита унутар постеличног ткива код пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и у контролној групи

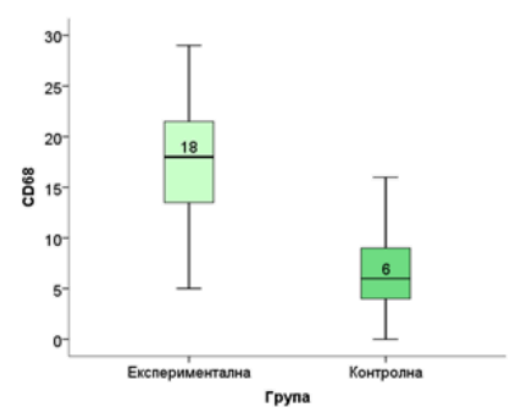


График 21: Расподела степена експресије CD68+ имунореактивности леукоцита унутар постеличног ткива код пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и у контролној групи

Табела 14: Просечна имунопозитивност на Spike, ACE2 и CD68+ At унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и контролне групе изражена као средња вредност $\pm$ СД

Променљива	Експериментална група		Контролна група	
	Мин-Макс	Просек $\pm$ СД	Мин-Макс	Просек $\pm$ СД
SPIKE	0-9	4,44 $\pm$ 2,98	0-4	0,73 $\pm$ 1,03
ACE2	0-9	3,15 $\pm$ 3,13	0-6	1,82 $\pm$ 2,28
CD68	0-39	18,11 $\pm$ 8,36	0-16	7,05 $\pm$ 4,39

Табела 15: Статистичка анализа разлике имунопозитивности на Spike, ACE2 и CD68 At унутар постепљичног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће и контролне групе обављена Ман-Витнијевим тестом.

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
SPIKE	4,463	-	0,000
ACE2	1,605	-	0,108
CD68	4,740	-	0,000

На основу резултата Ман-Витнијевог теста уочили смо статистички значајну разлику у експресији SPIKE протеина и CD68 макрофага између групе SARS-COV-2+ и контролне групе. ($p < 0,05$) (табела 15)

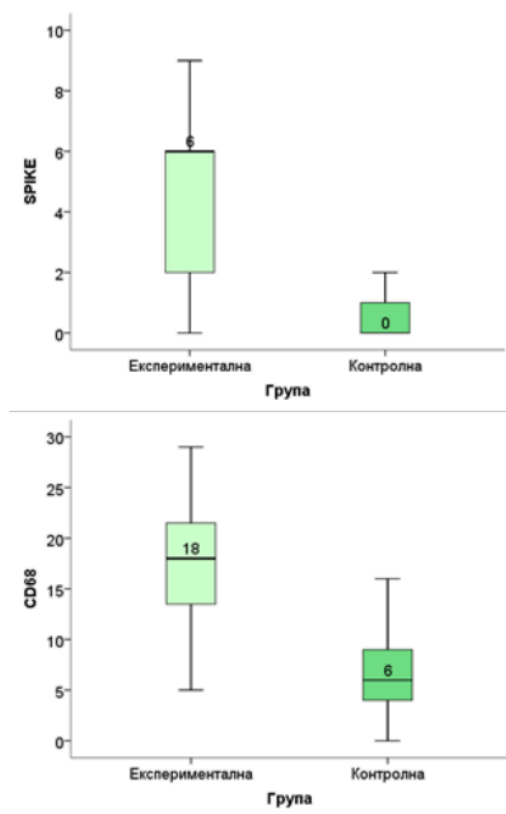


График 22: Приказана заступљеност имунореактивности на Spike протеин и CD68 маркер макрофага између SARS-COV-2+ и контролне групе

Табела 16: *Анализа експресије ACE2 рецептора, SPIKE протеина и CD68+ леукоцита унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће у односу на триместар у коме се десила инфекција*

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
SPIKE	1,579	2	0,454
ACE2	3,696	2	0,158
CD68	0,987	2	0,610

Статистички тест примењен у овој анализи- Хи-квадрат тест показао је да нема значајних разлика у експресији ACE2 рецептора, SPIKE протеина и CD68+ макрофага унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће у односу на триместар у коме се десила инфекција (тестирано за ниво значајности $p < 0,05$) (табела 16)

Табела 17: *Анализа експресије ACE2 рецептора, Spike протеина и CD68+ макрофага унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће у односу на тежину клиничке слике мајке.*

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
SPIKE	0,180	1	0,857
ACE2	1,211	1	0,226
CD68	0,349	1	0,727

Резултат статистичког теста примењеног у овој анализи (Ман-Витнијев тест) говори у прилог томе да нема статистички значајних разлика експресије ACE2 рецептора, Spike протеина и CD68+ макрофага унутар постеличног ткива пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће у односу на тежину клиничке слике мајке (за ниво значајности $p < 0,05$)(табела 17)

4.6. Детекција IgM антитела у крви новорођенчади на SARS-COV-2 вирус ELISA методом

Код 42,8 % новорођенчади мајки из SARS-COV-2 групе детектовано је присуство SARS-COV-2 IgM антитела у првом дану живота. Код новорођенчади у контролној групи нису регистровани позитивни налази IgM антитела у крви у првом дану живота. Средња вредност концентрације IgM At на SARS-COV-2 износила је 2,27 g/L са стандардном девијацијом 2,92, а у групи SARS-COV2- средња вредност концентрације је износила $0,29 \pm 0,26$. (табела 3) Помоћу Студентовог Т теста дошли

смо до закључка да постоји статистички значајна разлика између концентрација IgM At $p=0,044^*$ (табела 4, график 23).

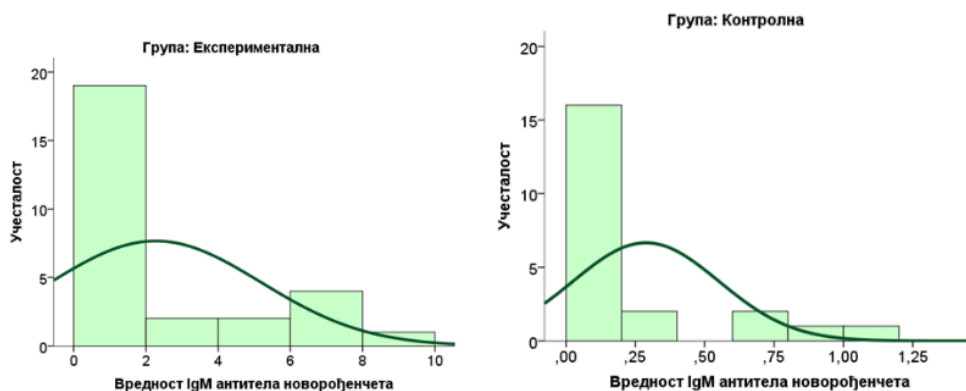


График 23: Концентрација SARS-COV-2 IgM AT код новорођенчади у првом дану мајки SARS-COV-2+ групе и контролне групе.

4.7. Испитивање повезаности перинаталног исхода са тренутком обољевања.

За анализу категоријских променљивих у односу на гестацијску недељу када је наступила SARS-COV-2 инфекција током трудноће примењен је Ман-Витнијев У тест а за графички приказ статистички значајних резултата коришћен је кутијасти (правоугаони) графикон.

За анализу нумеричких променљивих у односу на гестацијску недељу примењен је метод корелације и регресије, односно тумачена је вредност Спирмановог коефицијента корелације а за графички приказ статистички значајних резултата коришћен је дијаграм растурања. Тестирањем обележја перинаталног исхода путем Спирмановог теста корелације рангова са тренутком у ком је наступила SARS-COV-2 инфекција током трудноће дошли смо до резултата повезаности између масе постељице и недеље гестације у којој је наступила инфекција као и повезаности односа тежине постељице и масе новорођенчета и недеље гестације у којој је наступила инфекција (табела 18, график 24а, 24б)

Табела 18: Статистичка анализа повезаности перинаталног исхода са тренутком у трудноћи када се десила инфекција SARS-COV-2 тестирана Спирменовим тестом корелације рангова

	Коефицијент корелације	Број случајева	Значајност
Старост мајке	0,136	29	0,482
APGAR Score/1 min	-0,199	29	0,301
APGAR Score/5 min	-0,092	29	0,636
Телесна маса	0,017	29	0,929
Телесна дужина	0,142	29	0,462
ОГ	0,102	29	0,600
ГН	-0,042	29	0,828
Маса постељице	-0,439	29	0,017
Однос тежине постељице и масе детета	0,396	29	0,033
Пупчаник	0,056	29	0,772
Дужина хоспитализације детета	0,207	28	0,291
Боравак на интензивној нези	0,306	28	0,113
Број дана пре порођаја	-0,957	28	0,000
Вредност ИгМ	-0,028	28	0,886

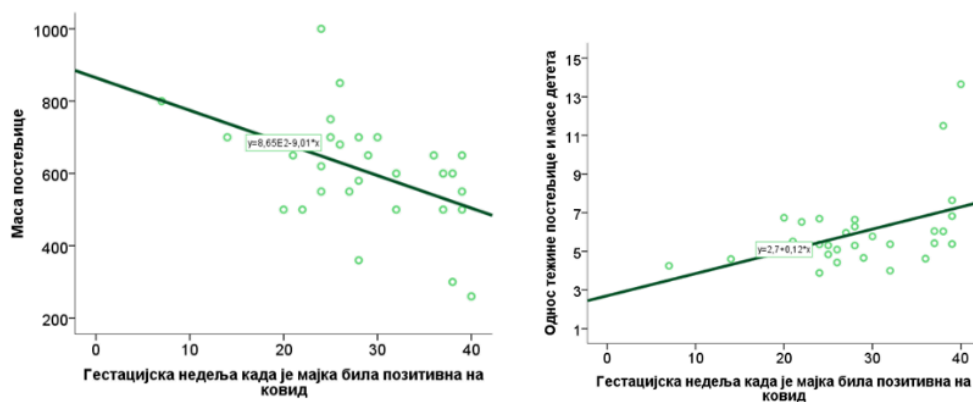


График 24: 24а-Корелација између масе постељице и недеље гестације у којој је наступила инфекција ($p=0,17$), 24б-Корелација између односа тежине постељице и масе детета и недеље гестације у којој је наступила инфекција ($p=0,33$)

Остала испитивана обележја нису показала статистички значајну корелацију.

4.8. Испитивање повезаности експресије Spike протеина у ткиву постељице заражених пацијенткиња са нивоом биомаркера оксидативног стреса мајке и плода

Табела 19: Статистичка анализа повезаности биомаркера оксидативног стреса и антиоксидативне заштите са експресијом Spike протеина унутар постељичног ткива Спирмановим тестом корелације рангова за ниво значајности $p < 0,05$.

	Број узорака	Ниво значајности	Коефицијент корелације
O2-M	46	0,676	-0,063
O2-P	46	0,515	0,098
H2O2-M	46	0,121	0,232
H2O2-P	46	0,234	0,179
NO-M	46	0,392	-0,129
NO-P	46	0,886	0,022
TBARS-M	46	0,048	0,293
TBARS-P	46	0,110	0,293
GSH-M	46	0,762	-0,046
GSH-P	46	0,901	0,019
SOD-M	46	0,322	-0,149
SOD-P	46	0,685	0,061
CAT-M	46	0,056	-0,283
CAT-P	46	0,203	-0,191

Испитивањем повезаности биомаркера оксидативног стреса и антиоксидативне заштите мајке и новорођенчета са експресијом Spike протеина унутар постељичног ткива уочена је позитивна корелације нивоа TBARS у серуму мајке са степеном имунореактивности на Spike протеин унутар постељичног ткива. ($p=0,048$, $R=0,293$) (табела 19)

4.9. Испитивање повезаности експресије Spike протеина са перинаталним исходом

Спирмановим тестом коефицијента рангова вршили смо испитивање повезаности перинаталног исхода са експресијом SPIKE унутар постељичног ткива за ниво значајности $p<0,05$. Боравак новорођенчета на интензивној нези у позитивној је корелацији са нивоом експресије Spike протеина у постељичном ткиву (график 25). ($p=0,021$, $R=0,33$)

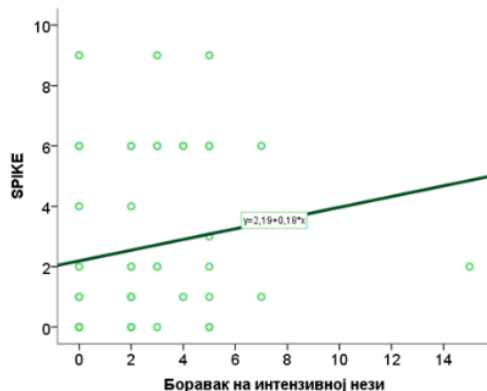


График 25: Корелација експресије S протеина унутар постељичног ткива са боравком новорођенчета на интензивној неонаталној нези

4.10. Испитивање повезаности експресије Spike протеина унутар постеличног ткива пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 са експресијом CD68+ макрофага и експресијом ACE2 рецептора унутар постеличног ткива

За анализу ИХХ у односу на нумеричке променљиве примењен је метод корелације и регресије, односно тумачена је вредност Спирмановог коефицијента корелације. За графички приказ статистички значајних резултата коришћен је дијаграм растурања. Тестирали смо повезаност експресије Spike протеина унутар постеличног ткива пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 са експресијом CD68+ макрофага и експресијом ACE2 рецептора унутар постеличног ткива путем Спирмановог теста корелације и дошли до резултата да постоји позитивна повезаност у експресији Spike

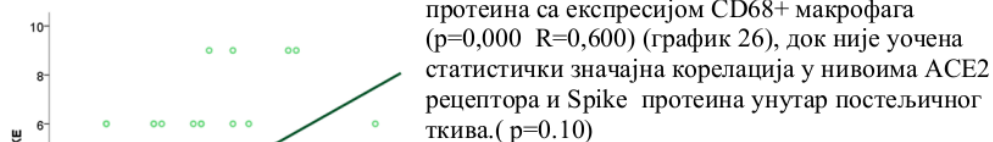
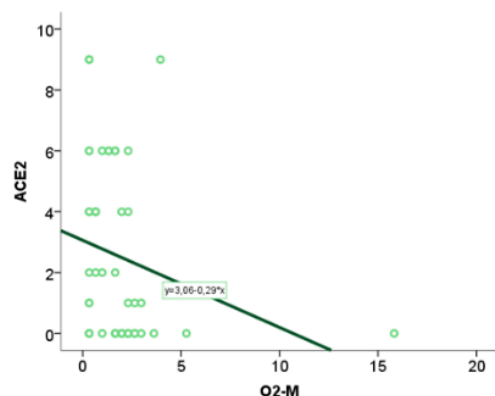


График 26: повезаност експресије Spike протеина унутар постеличног ткива пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 са експресијом CD68+ макрофага

4.11. Испитивање повезаности експресије ACE2 рецептора унутар постеличног ткива са биомаркерима оксидативног стреса мајке и новорођенчета

Статистичка анализа повезаности ACE2 рецептора унутар постеличног ткива са биомаркерима оксидативног стреса мајке и новорођенчета вршена је путем Спирмановог коефицијента корелације рангова за ниво значајности $p<0,05$.



Ниво експресије ACE2 рецептора у ткиву постелице повезан је са повишеном концентрацијом O2- анјона у крви мајке, док остали биомаркери оксидативног стреса не показују повезаност. (График 27.)

График 27: Приказана је негативна корелација експресије ACE2 рецептора и O2- анјона у серуму мајке ($p=0,014$, $R=-0,362$)

4.12. Испитивање повезаности експресије CD68+ макрофага у ткиву постељице са биомаркерима оксидативног стреса мајки и новорођенчади

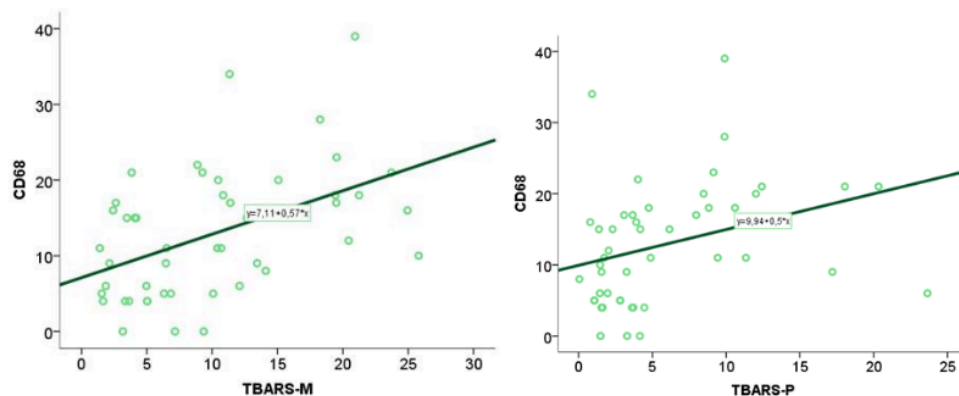


График 28: Повезаност експресије CD68 макрофага у постељичном ткиву са нивоом TBARS 28a-у серуму мајке ($p=0,001$, $R=0,481$), 28б-из крви пупчаника ($p=0,002$, $R=0,443$)

Испитивање повезаности експресије CD68+ макрофага у ткиву постељице са биомаркерима оксидативног стреса мајки и новорођенчади вршили смо помоћу Спирмановог теста корелације рангова. Резултати теста показали су повезаност TBARSa како у серуму мајке ($p=0,001$, $R=0,481$), тако и у серуму плода ($p=0,002$, $R=0,443$) са експресијом CD68+ у ткиву постељице. (График 28а и 28б).

4.13. Испитивање повезаности нивоа IgM SARS-COV-2 At у крви новорођенчета са нивоом биомаркера оксидативног стреса код мајке и новорођенчета

Повезаност биомаркера оксидативног стреса мајке и новорођенчета са концентрацијом IgM SARS-COV-2 At тестирали смо помоћу Спирмановог коефицијента корелације.

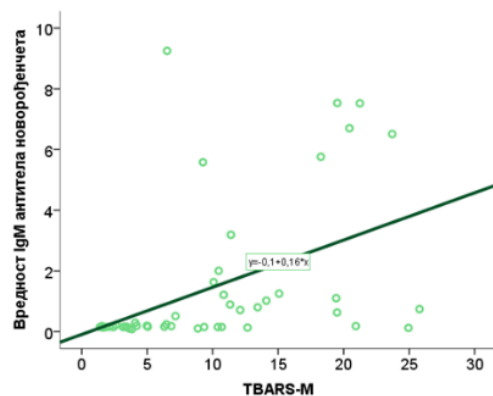


График 29: Приказана је позитивна корелација нивоа IgM SARS-COV-2 At у крви новорођенчета са нивоом TBARSa мајке ($p=0,000$, $R=0,544$)

Резултат теста показао је позитивну корелацију нивоа IgM SARS-COV-2 At у крви новорођенчета са нивоом TBARSa мајке ($p=0,000$, $R=0,544$) (график 29).

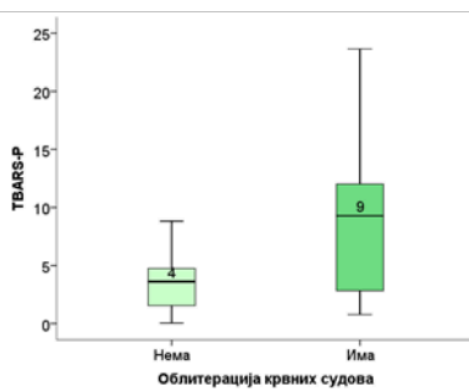
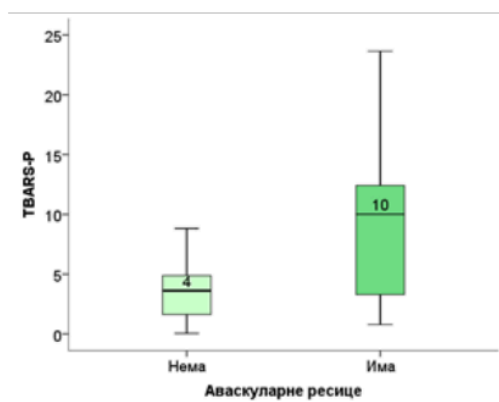
4.14. Испитивање повезаности патохистолошких налаза у ткиву постељице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 са нивоом биомаркера оксидативног стреса мајке и плода

За анализу параметара оксидативног стреса у односу на патохистолошке променљиве примењен је Ман-Витнијев У тест. За графички приказ статистички значајних резултата коришћен је кутијаста (правоугаони) графикон.

Тестирали смо повезаност појединачних патохистолошких налаза постељичног ткива пацијенткиња оболелих од SARS-COV-2 са нивоом биомаркера оксидативног стреса мајке и новорођенчета и дошли до следећих резултата:

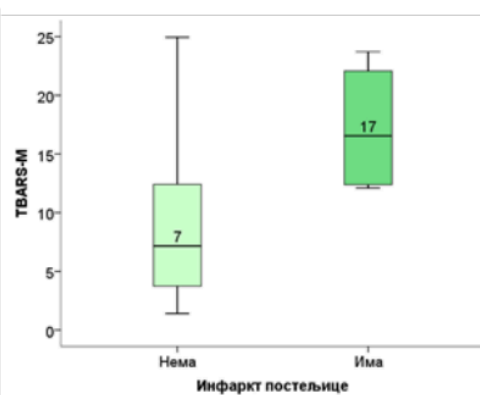
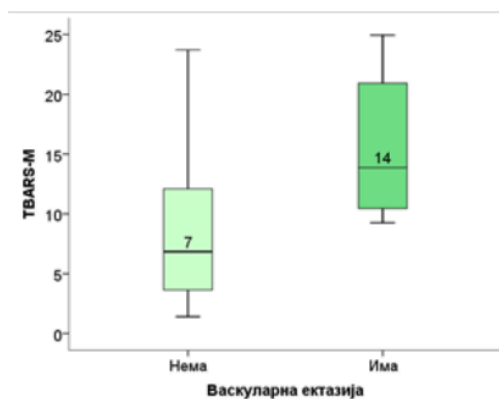
Ниво TBARSa новорођенчета значајно је био повишен код трудница са налазом аваскуларних ресица (график 30а), као и облитерацијом крвних судова (график 30б), док ниво TBARSa мајке позитивно корелира са налазима васкуларне екстазије (график 30в.) као и инфаркта постељице (график 30г).

Ниво каталазе мајке у позитивној је корелацији са постојањем ретроплацентног хематома (график 30д), а ниво NO_2^- плода је у позитивној корелацији са постојањем FVM промена (график 30ђ).



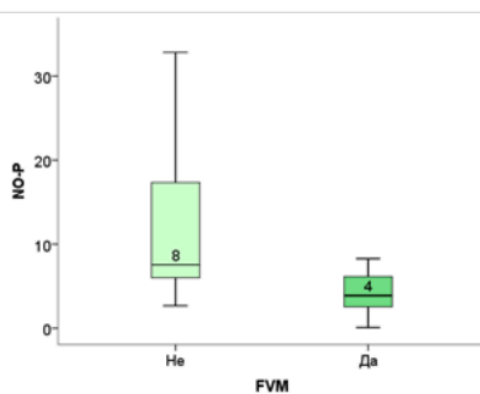
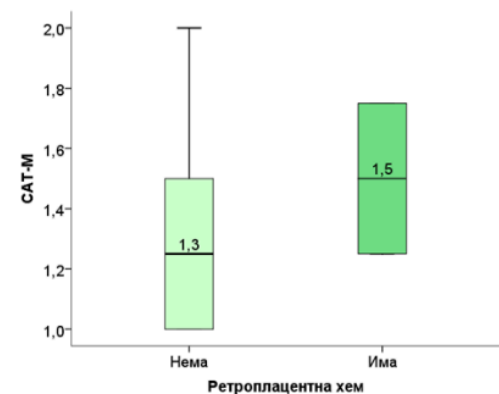
а

б



в

г



д

ђ

График 30: а) Ниво TBARSa новорођенчета у односу на присуство аваскуларних ресица ($p=0,048$), б) Повезаност између TBARSa новорођенчета и облитерације крвних судова ($p=0,038$), в) повезаност између TBARSa мајке и васкуларне ектазије ($p=0.029$), г) повезаност између TBARSa мајке и инфаркта постељице ($p=0.027$), д) повезаност

између нивоа каталазе мајке и ретроплацентног хематома ($p=0.028$), *ђ*) повезаност између новог *NO* плода са присуством *FVM* ($p=0.002$)

4. ДИСКУСИЈА

5.1. Демографски подаци и клиничке карактеристике трудница оболелих од COVIDa-19 током трудноће

У обе испитиване групе пацијенткиња просечна старост испитаница је била је слична што елиминише потенцијални утицај старости пацијенткиња на настанак промена унутар постеличног ткива као и евентуални утицај старости пацијенткиња на редокс статус мајке и новорођенчета што представља закључак претходних студија. (166)

Средња вредност дужине трајања трудноће била је слична у обе испитиване групе, дакле без статистички значајне разлике што елиминише потенцијални утицај трајања гестације на перинатални исход и оксидативни статус новорођенчета.

Већина пацијенткиња је имала изражене и тешке симптоме COVIDa-19 при чему су три пацијенткиње биле хоспитализоване ради лечења пнеумоније. Студије које су се бавиле испитивањем повезаности утицаја SARS-COV-2 инфекције на трудноћу показале су позитивну корелацију тежине симптома COVIDa-19 са израженим лезијама постеличног ткива и порастом оксидативног стреса у трудноћи. (167–169) Резултати наше студије показали су да нема статистичке разлике у учесталости патохистолошких промена постеличног ткива унутар подгрупа сврстаних према тежини клиничке слике, док је ниво NO₂- мајке био значајно повишен у подгрупи са тежом клиничком сликом.

Наша студија показала је да нема статистички битног пораста броја царских резова код пацијенткиња оболелих од COVID-19 током трудноће, но примећена је већа учесталост оперативног завршавања порођаја у подгрупи са тежом клиничком сликом COVID-19. Студије које су се бавиле овом проблематиком имале су контрадикторне резултате, неке су показале повишен ризик од оперативног завршавања порођаја код COVID-19 оболелих (170–172) док су друге показале да начин порођаја не зависи од COVID-19 инфекције у трудноћи. (173)

5.2. Демографски подаци и клиничке карактеристике новорођенчади мајки оболелих од COVID-19 током трудноће

Анализа биометријских карактеристике новорођенчади на порођају показала је да се телесна маса, телесна дужина и обим главе нису су битно разликовали међу новорођенчади из SARS-COV-2+ и SARS-COV-2- групе. Студије које су се бавиле сличним истраживањима показале су повезаност симптома COVID-19 и телесне тежине на рођењу, ризика од прематуритета и вентилације у раном неонаталном периоду. (174)

Средња старост гестације на рођењу била је без значајних разлика међу групама тако да новорођенчад мајки оболелих од COVID-19 не показују ризик од прематуритета, а обзиром на не постојање разлике у трајању трудноће у обе групе можемо искључити ефекат разлике у гестацијској старости на параметре неонаталног исхода-Апгар скор, телесну тежину, дужину, обим главе, дужину хоспитализације и боравак на интензивној нези новорођенчади. Студије које су се бавиле телесним мерама новорођенчета и BMI показале су да на рођењу постоје значајне разлике у овим мерама, међутим током прве године живота постоји акцелерација раста ових новорођенчади. (175)

Смањена маса постелице може бити показатељ измењене метаболичке функције и потенцијални ризик за плод. (176) Наша студија показала је да нема значајних одступања масе постелице и односа П/ТТ (постелица/телесна тежина плода) међу испитаницама из SARS-COV-2+ групе и контролне групе и у сагласности је са досадашњим студијама. Додатном анализом утврдили смо повезаност недеље када је мајка инфицирана током трудноће са измењеном масом постелице и односа телесне тежине постелице/плода.

Што је инфекција наступила у ранијој гестацији маса постељице и однос масе постељице и телесне тежине плода био је мањи што може указивати на лошији перинатални исход.

Поједине студије говоре у прилог томе да пол утиче на оксидативни статус новорођенчета.(75) У нашој студији расподела новорођенчади према полу у групама биле је без значајних статистичких разлика.

У погледу неонаталног исхода наша студија је забележила следеће резултате: Апгар скор новорођенчади (1' и 5') мајки које су припадале SARS-COV-2+ групи статистички се значајно није разликовао од апгар скорa новорођенчади контролне групе. До сличних закључака дошле су и савремене студије те се намеће закључак да апгар скор не представља валидан показатељ угрожености новорођенчета самом инфекцијом, те је вероватно више одраз изражених симптома COVIDa-19 код мајке током порођаја. (177)

Новорођенчад мајки из SARS-CoV-2 групе имала су сличну средњу дужину хоспитализације као и новорођенчад из контролне групе. Дужина хоспитализације нема дијагностички значај у процени неонаталног исхода јер студије које су се бавиле овом проблематиком показују некохерентне резултате, најпре као последицу различитих критеријума који утичу на дужину хоспитализације, а затим и због разлика у начину и нивоу организације службе за збрињавање новорођенчади унутар болница у којима су обављани порођаји трудница оболелих од COVIDa-19. Није било ни значајног скраћења дужине хоспитализације новорођенчета и мајке упркос тенденцији смањења дужине хоспитализације и суспензије елективних пријема као што је и Гаetanoва студија показала. (178)

Дужина боравка новорођенчади на одељењу неонаталне интензивне неге била је значајно дужа у SARS-COV2+ групи у односу на контролну групу. Пријем и дужина хоспитализације на одељењу интензивне неге новорођенчади поред урицаја COVID-19 инфекције зависи од начина порођаја, телесне тежине новорођенчади и старости трудноће. Додатно анализирајући параметре перинаталног исхода код подгрупа SARS-COV-2+ пацијенткиња у односу на тежину клиничке слике мајке добили смо статистички значајну разлику у односу на дужину хоспитализације новорођенчета и боравка новорођенчета на одељењу интензивне неонаталне неге у групи пацијенткиња са тежим симптомима. Наши резултати поткрепљују препоруке експерата из области о неопходности доступног мултидисциплинарног тима у болницама које збрињавају SARS-COV-2+ труднице и њихову новорођенчад. (179) Додатно, у оквиру организације здравствене службе неопходно је постојање неонаталне јединице интензивног лечења за болнице које збрињавају ове високоризичне труднице.

5.3. Трансплацентна трансмисија SARS-COV-2 вируса на плод.

Постоје неколико потенцијалних матернално-феталних путева ширења инфекције. Фетална инфекција може се десити унутар материце, директном трансплацентном трансмисијом. Други могући начин је интрапартална инфекција (контакт новорођенчета са зараженом вагиналном секрецијом или крвљу) и трећи начин је након рођења путем директног контакта мајке и новорођенчета или дојењем. (146) Плацента је орган који својим протективним механизмима спречава пропагацију SARS-COV-2 вируса на плод, међутим, инфламационе или васкуларне лезије могу допринети слабљењу плацентне баријере и фаворизовати директну трансмисију.(180)

Сва новорођенчад мајки са активном SARS-COV-2 инфекцијом тестирана су путем SARS-COV-2 RT-PCR теста назофарингеалног бриса, а само један резултат је био позитиван. Присуство IgM антитела на SARS-COV-2 у крви новорођенчета детектовано је у 42% случајева новорођенчади мајки из SARS-COV-2+ групе, док у контролној групи

није било забележених позитивних резултата. Код новорођенчади мајки SARS-COV-2+ групе уочена је значајно разлика у нивоу SARS-COV-2 IgM антитела у односу на контролну групу. Међу подгрупама формираним у односу на тежину клиничке слике и на триместар у коме се одиграла инфекција није било значајних разлика у концентрацији IgM антитела. За утврђивање трансплацентне трансмисије SARS-COV-2 на плод код новорођенчета предложено је серолошко одређивање концентрације специфичних IgM антитела на SARS-COV-2 обзиром на непознато место примоинфекције. (72,73) IgM антитела као део имуног одговора на специфичну вирусну инфекцију, за разлику од IgG антитела, немају способност проласка кроз плацентну баријеру те могу бити корисна у одређивању потенцијалне директне трансмисије на плод, међутим слаба страна ове методе је постојање укрштене реакције и лажно позитивног резултата те PCR тест назофарингеалне/орофарингеалне слузнице представља златни стандард за одређивање присуства SARS-COV-2 инфекције код новорођенчета. (3) Студије које су се бавиле серолошким испитивањем SARS-COV-2 антитела у крви новорођенчета одмах након рођења на основу позитивних налаза закључиле су да вертикална трансплацентна трансмисија SARS-COV-2 могућа током трудноће. (195–197) Слична студија коју је спровео Maranto показала је позитиван налаз SARS-COV-2 IgM антитела код 2.4% новорођенчади. (174) Иницијалне студије фокусиране на директну трансмисију показале су да не постоје уверавајући подаци о овом начину заражавања. Крајем пандемије светске пандемијске мета анализе показале су да је око 8.8% новорођенчади COVID-19 позитивних мајки на рођењу имало позитиван SARS-COV-2 PCR или серолошки тест добијен тестирањем узорка назофарингеалног бриса. (53,68) Начин утврђивања директне трансмисије са мајке на плод је предмет научних спорења. Код одраслих, респираторни тракт је место примоинфекције са највишом концентрацијом вируса, те је се анализа узорака спроводи узимањем натофарингеалног или оралног бриса. Студије које су се бавиле директном матернално-феталном трансмисијом користиле су методу RNA Score и in-situ хибридизацију унутар сцинциотиотробластних ћелија, али основни проблем у интерпретирању резултата је недоследност. Сензитивност RT-PCR теста је највиша из узорка бронхијалне лаваже (93%), а значајно је нижа из назофарингеалног бриса и фецеса (63% и 29%), али као инвазивни овај метод није погодан за тестирање трудница ни новорођенчади. (71) Испитивање начина могуће трансмисије са мајке на плод значајно је јер би донело значајне информације које се тичу начина завршавања порођаја, неонаталне неге, потребе за изолацијом и безбедног дојења. (181)

5.4. Поређење параметара оксидационог стреса и антиоксидационе заштите мајки и новорођенчади из трудноћа оптерећених SARS-COV-2 инфекцијом и контролне групе

Трудноћа сама по себи представља стање повишеног оксидативног стреса захваљујући интензивним метаболичким и имунолошким алтерацијама неопходним за комплексан процес раста и развоја продуката концепције. Главни извор ROS у трудноћи је постелица при чему су ови молекули кључни чиниоци комплексног система задуженог за међућелијску сигнализацију, транскрипцију, адаптивну хомеостазу и апоптозу и одбрану домаћина путем фагоцитозе. (85–88) Вирусне инфекције утичу на побуђивање оксидативног стреса домаћина путем бројних механизма као што су прекомерна продукција цитокина, активација система комплемената, ослобађање липидних медијатора и липидном пероксидацијом током интеракције одбрамбених ћелија организма са вирусним патогенима. (89,90) Током ове интеракције студије су показале пораст активности мијелопероксидазе, NADPH синтетазе и индуцибилне NO синтетазе као и промене нивоима ензимских и неензимских антиоксиданаса као што су супероксид дизмутаза (SOD), глутатион

пероксидаза и каталаза, те витамин С, витамин Е, каротеноиди, глутатиони флавоноиди. (91–95) Уколико прекомерна продукција ROS надмаши антиоксидативни капацитет плаценте може доћи до оштећења ткива (89,96). Одређивање појединачних биомаркера оксидативног стреса у предикцији плацентне патологије нема научни ни клинички значај, али упоредо испитивање приликом порођаја показало је позитивну корелацију повишених вредности биомаркера ОС у крви мајке и крви из умбиликалне врпце новорођенчета. (91)

Утицај оксидативног стреса мајке на оксидативни стрес плода зависи од антиоксидативног капацитета новорођенчета који је детерминисан генетски, у зависности од пола плода, зрелости плода, година мајке. (75) Наша студија дефинисала је факторе укључења и факторе искључења из студије како би смањила утицај потенцијалних промотера оксидативног стреса, као што су присуство хроничних болести мајке, дијабетес мелитуса, хипертензивних пормећаја у трудноћи, тромбофилије, конзумирање дувана. Просечна старост пацијенткиња изражена у годинама била је без значајних разлика међу групама. Просечна гестацијска старост плода, такође, није се битно разликовала међу групама. На овај начин умањен је потенцијални утицај старости пацијенткиња као и старости плода на оксидативни стрес мајке и новорођенчета на порођају.

Наша студија показала је статистички значајне разлике код вредности радикала супероксидног аниона, водоник пероксида и индекса липидне пероксидације код мајки у погледу присуства инфекције SARS-COV-2.

O₂⁻ ниво био је значајно повишен код мајки контролне групе, а нивои H₂O₂ били су значајно виши код мајки и новорођенчади контролне групе што одговара начину завршавања порођаја. SC је био учествовао у контролној групи у односу на COVID-19 групу. Начин порођаја значајно утиче на повишене биомаркере оксидативног стреса код новорођенчади, где су оне повишене код пролонгираног вагиналног порођаја, код хитног царског реза као и стимулисаног порођаја синтоциноном. (78,95–97) Водећи узрок царског реза у контролној групи је био неуверљив фетални статус и претходни царски рез.

TBARS имао је значајно повишене вредности у групи SARS-COV-2+ у односу на контролну групу, као и у SARS-COV2+ групи новорођенчади у односу на контролну групу потенцијално као последица оштећења липидних мембрана дејством вируса SARS-COV-2. Студије које су се бавиле испитивањем плацентног TBARSa PCR методом као и испитивањем серумског нивоа овог биомаркера дошле су до сличног закључка. (182)

Ниво редукваног глутатиона и супероксид дизмутазе били значајно различити код новорођенчади у зависности од инфекције SARS-COV-2 мајке. Ови подаци у сагласности су са теоријом адаптивне способности постељице како би балансирала побуђени оксидативни стрес након инфекције мајке и омогућила несметан раст и развој плода, у прилог чему говори и непоремећен неонатални исход код новорођенчади мајки инфицираних током трудноће. Научни покушаји да се идентификују значајни биомаркери оксидативног стреса имали су контрадикторне закључке, неке студије су издвојиле значај SOD и CAT (182,183), док су друге утврдиле да нема SOD не поседује клинички ни научни значај у предвиђању плацентних лезија и неонаталног исхода код трудница оболелих од COVID-19. (184)

Ниво NO био је значајно нижи код новорођенчади унутар групе SARS-COV-2 позитивних мајки што указује да плацента мајке која инфицирана SARS-COV-2 не

поседује способност да се успешно супротстави продукцији ROS након и током SARS-COV-2 инфекције. NO је укључен има комплексну улогу у регулацији физиолошких процеса организма која се огледа у вазодилатацији, инхибицији адхезије и агрегације тромбоцита, модулацији производње тромбоцита као и имуномодулацији. (185)

Повишен ниво SOD у групи SARS-COV-2+ групи новорођенчади сугерише да је плацента развила ензимски систем заштите против оксидативног стреса који се огледа у активном супротстављању и детоксикацији слободних радикала у циљу постизања оксидативног баланса и спречавању липидне пероксидације. Савремене студије које су се бавиле матерналним и неонаталним исходом узимајући у обзир и утицај SARS-COV-2 на ткиво постељице дошле су до закључка да постељица поседује способност неутралисања оксидативног стреса развијањем антиоксидативних механизма. (182)

Поједине студије предлажу да одређивање различитих типова биомаркера OS из умбиликалне врпце, плаценте и матерналне крви може имати примену у предикцији плацентних патолошких лезија и клиничке симптоматологије. (82) Наша студија показала је да TBARS може имати клиничку примену у идентификацији високо-ризичних COVID-19 трудноћа које захтевају ближе праћење и неонаталну негу и пажљиво праћење неонаталног развоја. Остали биомаркери OS у нашем истраживању више су зависили од начина порођаја и постеличне способности да балансира новонастали оксидативни стрес.

Анализа нивоа биомаркера оксидативног стреса и антиоксидативне заштите између подгрупа формираних у односу триместар у коме се десила инфекција SARS-COV-2 нису показале значајне статистичке разлике (табела 8), док код погрупа формираних у односу на тежину клиничке слике вредности нивоа NO- у крви мајке пацијенткиња са тежом клиничком сликом биле су значајно повишене у односу на контролну групу (табела 9).

5.5. Анализа морфолошких хистопатолошких промена унутар ткива постељице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће

Обзиром да патохистолошка анализа постеличног ткива представља јединствен и драгоцен извор у расветљавању патохистолошких механизма дејства SARS-COV-2 вируса у трудноћи и евентуалне директне трансплацентне трансмисије бројни истраживачи бавили су се овом тематиком, међутим резултати спроведених студија си инкохерентни, захваљујући мноштву збуњујућих фактора, разноврсним критеријумима и номенклатуром у класификацији патохистолошких промена постељице као и избору контролне групе.

Поједине студије детектовале су учестало присуство патолошких промена типа матерналне васкуларне малперфузије (MVM), док су друге детектовале промене типа феталне васкуларне малпрефузије (FVM), дијагностиковане према Амстердамском консензусу радне групе за патологију постељице, на основу стране постељице на којој су се промене појавиле. (115–119) Уз васкуларне промене детектоване су и инфламационе хистопатолошке промене по типу хистиоцитних интервилитиса, вилитиса, фунизитиса и хориоамнионитиса. (120,186) Бројне студије које су се бавиле испитивањем макроскопских и микроскопских промена унутар плацентног ткива пацијенткиња инфицираних током трудноће приказале су до разнолике резултате који укључују значајно учесталије присуство FVM, друге пак учесталије MVM и инфламационе лезије. (108–114) Поједине студије су чак дошле до закључка да нема специфичних патохистолошких лезија постељице код пацијенткиња оболелих од COVID-19 током трудноће без обзира на време обољевања или тежину клиничке слике

пацијенткиња. (121,187) Слабост ових студија огледа се у малом броју узорака, недоследностима у класификацији хистопатолошких лезија, доприносећим факторима у настанку хистопатолошких лезија постељице током трудноће као што су присуство хроничних болести и животне навике пацијенткиња, као и адекватан избор контролне групе.

Наша студија је показала да се учесталост патохистолошких налаза битно разликује међу групама испитиваних пацијенткиња. Пронашли смо да су патохистолошке промене типа FVM значајно заступљеније унутар постељица пацијенткиња заражених SARS-COV-2 током трудноће у односу на постељице контролне групе. MVM лезије биле су детектоване учесталије унутар постељица пацијенткиња SARS-COV-2 групе у односу на постељице пацијенткиња контролне групе. У односу на специфичне ентитете наша студија је приказала да постоји статистички значајна уочена разлика у заступљености васкуларних ектазија, облитерацији крвних судова и аваскуларним ресицама између ове две групе пацијенткиња.

Подаци из литературе показују да су претходно спроведених двадесет студија детектовале присуство FVM у 35% испитиваних постељица док наводиле учесталост MVM у 46% , вилитис у 8.7%, интервилитис у 6% и хориоамнионитис у 6% испитаних постељица. (118,188)

Најчешћи патохистолошки налази у нашој студији по заступљености су били: облитерација крвних судова, аваскуларни вилуси, ретроплацентна хеморагија и убрзана матурација вилуса (табела 6). Код претходних студија у литератури доминирали су налази фибринских депозита, микро-калцификација, тромба, аваскуларни вилуси, инфаркт и едем вилуса. (189)

У погледу перинаталног исхода студије које су се бавиле проблемом MVM дошле су до закључка да су ове врсте плацентних лезија биле асимптоматске, али њихов кумулативни ефекат се огледао у плацентној хипоперфузији која је водила ка неповољном перинаталном исходу и феталним компликацијама повезаним са настанком прееклампсије и интраутериног застоја у расту плода (IUGR). (122,142–144) IUGR је немогућност плода да достигне свој генетски потенцијал током интраутериног раста и присутан је у приближно 15% трудноћа. (145)

FVM лезије су повезане са абнормалностима централног нервног система плода, IUGR, феталним срчаним абнормалностима, интраутерином смрћу плода и мртворођеношћу. (115,130,146,147)

Поремећај плацентне функције је одговоран за краткорочни и дугорочни неповољни исход мајке и новорођенчета. Краткорочне последице захтевају хитну интервенцију током антерпарталног и перипарталног периода. RCOG предложио је ултразвучни преглед труднице заражене SARS-COV-2 две до три недеље након ремисије како би се пратио фетални раст. (190) Плацентне патолошке лезије могу бити вредан траг у откривању дугорочних последица које захтевају посебну пажњу. (191) Свакако, патолошки налаз испитиваног плацентног ткива морао би бити достављен не само гинекологу, што је уобичајена пракса, већ и педијатру како би идентификовао пацијенте са потенцијалним ризиком за настанак одложених развојних компликација. (192) Постоје докази да је плод изложен SARS-COV-2 инфекцији интраутерино десет пута подложнији настанку застоја у неролошком развоју, те би за ову новорођенчад морало бити обезбеђено редовно праћење. (193) Поремећај нервног развоја није лако препознатљив клинички, према томе потребно је одредити временске оквире у којима би ова група новорођенчади била праћена кроз рано детињство, прешколски и школски период. (191)

Будући да су раст и развој постељице динамичан процес контролисан генетски и имунолошки, моменат када се десила SARS-COV-2 инфекција током трудноће може бити важан фактор у настанку хистопатолошких промена и матерналног и феталног исхода. Поједине студије потврдиле су су да је тај моменат заражавања у трудноћи круцијалан за развој патохистолошких плацентних лезија. (115) Наша студија је показала да међу подгрупама SARS-COV-2 групе трудница формираним у односу на триместар у коме се догодила инфекција није било значајних статистичких разлика у учесталости испољавања патохистолошких лезија постељице.

Генетске абнормалности плода повезане су са настанком плацентних лезија и неповољног неонаталног исхода те би будуће студије које се баве овом проблематиком морале узети у разматрање извођење неинвазивног пренаталног дијагностичког теста као поуздану алтернативу за инвазивне методе у разоткривању генетских абнормалности потомства испитаница. (194)

На почетку наше студије COVID-19 вакцине нису биле доступне у нашој земљи. Током студије када је отпочела вакцинација није било јасних препорука које се тичу вакцинације против COVID-19 током трудноће. Министарство здравља Републике Србије препоручило је вакцинацију трудница у марту 2022. када је прикупљање материјала за нашу студију било завршено. Препорука се односила на све пацијенткиње у ферилној доби, без потребе за одлагањем трудноће или вакцинације током читавог периода трудноће Pfizer-BioNTech вакцином(201) Чак и тада, прихватање вакцинације код трудница је било веома ниско. Прихватање вакцинације зависи од нивоа образовања пацијената, изграђених личних баријера према вакцинисању али и од савета гинеколога, (196) те је неопходно спровођење студија које би обезбедиле више адекватних информација о безбедности примене вакцине против COVIDa-19 доступних како лекарима, тако и пацинеткињама. Будуће студије морале би да узму у разматрање и вакцинални статус против SARS-COV-2, као и потенцијални утицај вакцина на патолошке промене плацентног ткива и потенцијални матернални и неонатални исход. Будуће студије требало би да детерминишу и подваријанте SARS-COV-2 вируса јер су подаци из литературе показали да постоје разлике у матерналном и феталном исходу у зависности од присуства варијанте Alpha, Delta, или Omicron. (197)

Поред потенцијалног ризика у трудноћи који потиче од плацентних лезија и повећаног оксидативног стреса повишен је ризик и од психолошког стреса који утиче на ментално здравље трудница током COVID-19 пандемије. Током пандемије је примећен повишен број самоубистава и самоповређивања. (227) Поједине студије показале су везу између неуроza и страха од COVIDa-19, а неурозе су предиктор депресије. (227) Пацијенткиње из ове групе високоризичних трудноћа захтевају континуирану психолошку подршку током ових читавог деликатног животног тренутка која би требало да се прошири и на период након порођаја. (228)

5.6. Анализа експресије ACE2 рецептора у ткиву постељице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће

Комплексна улога ACE2 рецептора у патогенези COVIDa-19 доказана је бројним истраживањима. (209–211) Levi је у својој студији још 2008. год доказао на анималном моделу да је експресија и активност ACE2 рецептора повећана током трудноће, са највише детектованом експресијом у постељици. (46) Поједине студије показују динамичке промене у коекспресији овог рецептора кроз гестацију на ћелијама постељице и фетуса чинећи их подложним за инвазију SARS-COV-2 вируса. (54,60–62) Наша студија је није детектовала статистички значајну разлику у експресији ACE2 рецептора ткиву постељице пацијенткиња заражених SARS-COV-2 вирусом током трудноће и контролне групе, нити између подгрупа формираних у односу на тежину

клиничке слике или триместар у коме се одиграла инфекција. (табела 15, 16 и 17). Имунопозитивност је уочена на мембранозној страни цитотрофобласта и ређе синциотиотрофобласта и мононуклеарних фагоцита (слика 5). Додатно, наша студија је показала позитивну корелацију нивоа експресије ACE2 рецептора у ткиву постељице са повишеном концентрацијом O2- анјона у крви мајке. Овај податак говори у прилог томе да су пацијенткиње са израженом експресијом ACE2 рецептора подложније настанку оксидативног стреса и потенцијалних компликација COVIDA-19.

Обзиром да овај рецептор представља и улазно место SARS-COV2 вируса у ћелију, везивање вируса доводи до компетитивне инхибиције рецептора која је одговорна за вазодилатацију, и активацију система комплемена који воде ка ендотелној дисфункцији и настанку микротромбоза у овом протромботичком окружењу. (54,60–62) Но, ACE2 није само рецептор већ је одговоран и за продукцију цитокина, имуни одговор и репликацију вирусног генома, (45) већ је инволвиран регулисању два важна хормонална система RAS (Renin-angiotenzin) и Kalikrenin-kinin (KKS) током трудноће, те је смањена функција ACE2 рецептора повезана са настанком прееклампсије и интутеруног застоја у расту плода услед неадекватне плацентације и хемодинамске адаптације на трудноћу. (54,63–65)

Нескит и сарадници пронашли су у својој студији да SARS-COV-2 не доводи до специфичних макроскопских нити хистопатолошких промена постељичног ткива, али су демонстрирали присуство ACE2 рецептора на мембранозној страни синциотиотрофобласта хорионских вилуса као и на мембранозној страни цитотрофобласта и екстравилусног трофобласта, а без експресије у стромалним ћелијама постељице. (212) Како и сами аутори наводе слабост ових студија огледа се у избору контролне групе, при чему се користи узорци плаценти пре COVID-19 пандемије али из трудноћа оптерећених патологијом друге врсте која такође може утицати на патолошке промене унутар ткива постељице. Verma је имунохистехемијском методом детектовао смањење ACE2 рецептора на ћелијама постељице заражених пацијенткиња, што говори у прилог да су рецептори окупирани SARS-COV-2 вирусом. (213)

За улазак SARS-COV-2 у ћелију није довољан само ACE2 рецептор већ је неопходна је коекспресија са трансмембранском серин протеазом 2 (TMPRSS2), која врши цепање протеина S и на тај потпомаже улазак вируса у ћелију, те би тема истраживања будућих студија могла бити коекспресија ова два протеина и утицај на исход трудноће. Pique и Regi су у својој студији која је изучавала коекспресију ова два рецептора унутар ћелија плацете путем single cell RNA секвенционирања, показали да је она занемарљива те је директна трансмисија кроз постељицу мало вероватна. (182,214) Becker је у својој студији која се такође бавила испитивањем коекспресије ова два рецептора имунофлуоресцентном методом показао да је коекспресија у ћелијама цитотрофобласта и синциотиотрофобласта ниска док је значајнија у стромалним CD68+ макрофагима те у физиолошким условима постељица представља адекватну беријеру за директној трансмисији SARS-COV-2 вируса. (180)

5.7. Анализа експресије Spike (S) протеина у ткиву постељице пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће

Утицај SARS-COV-2 на постељично ткиво и плод доказан је бројним студијама, као и у нашој али директна трансмисија остаје и даље научна контроверза. Подаци из литературе говоре о детектованој директној трансмисији у свега свега у 4-8% случајева. (53,68,198,199) Место уласка вируса у ћелију постељице, као и механизам испољавања дејства и утицај на трудноћу и даље интригирају научну јавност због недовољно јасних и кохерентних резултата студија.

Наша студија бавила се имунохистохемијском детекцијом присуства Spike протеина као и његовом локализацијом унутар ћелије постељице. Резултати наше студије показали су статистички значајну разлику у експресији S протеина између SARS-COV-2+ групе трудница и контролне групе. Имунореактивност је примећена у највећем степену унутар ћелија цитотрофобласта, а затим синциотиотрофобласта и интервилозних моноклеарних ћелија. Између група подељених у односу на триместар у коме се десила инфекција и тежину клиничке слике није било статистички значајних разлика у експресији протеина S унутар постељичног ткива.

Додатно утврдили смо позитивну корелацију између имунореактивности на Spike протеин унутар постељичног ткива и нивоа TBARS у серуму мајке са степеном што нам указује на повишен ниво оксидативног стреса код мајки са идентификованом плацентном SARS-COV-2 инфекцијом. TBARS има значаја у идентификацији пацијенткиња са високим ризиком за настанак компликација у трудноћи и неонаталном периоду.

У погледу перинаталног исхода, боравак новорођенчета на интензивној неонаталној нези у позитивној је корелацији са нивоом експресије Spike протеина у постељичном ткиву. ИХХ анализа имунореактивности на Spike антиген значајна је у откривању новорођенчади са ризиком за настанак раних неонаталних и касних развојних компликација.

Студија спроведена од стране Taglaue и сарадника детектовала је присуство SARS-COV-2 Spike протеина унутар ћелија вилуса, и то заједно са ACE2 рецепторима у спољашњем слоју синциотиотрофобласта. (200) Остале студије које су се бавиле сличном проблематиком детектовале су имунохистохемијском методом присуство S протеина унутар ћелија синциотиотрофобласта, знатно нижу експресију унутар цитотрофобласта, стромалних ћелија ендотелних и интервилозних моноклеарних ћелија. (120,201,202) Верма и сарадници су у својој студији показали да су унутар постељице превремено порођених пацијенткиња детектован значајно виши ниво S протеина унутар ћелија децидуе, трофобласта и Хофбарових ћелија. (203) Студија спроведена од стране Guoa и сарадника такође је ИХХ методом доказала присуство појачане имунореактивности према протеину S унутар ендотелних ћелија узорака плаценте инфицираних пацијенткиња, али се поред тога бавила и испитивањем рекомбинованог протеина S на култури трофобластних и ендотелијалних ћелија постељице. Закључак ове студије је да протеин S утиче на значајно повећање нивоа инфламаторних цитокина и хемокина у обе врсте ћелија, трофобласта и ендотелних, док је повишен ниво ткивног фактора 3 примећен у ћелијама плацентног микроваскуларног ендотела. (204) Из изложеног се може закључити да је протеином S индуковано ослобађање цитокина и хемокина окidaч за настанак цитокинске олује - кључног фактора за настанку плацентних лезија и матерналних и фаталних компликација, док повишен ниво ткивног фактора три доприноси тромботичким дешавањима и васкуларним плацентним лезијама.

Подаци из литературе који се тичу детекције SARS-COV-2 унутар плацентног ткива веома су инкохерентни у тој мери да су неке студије вирус детектовале у 100% испитиваних узорака док су друге негирале његово присуство унутар узорака плаценте заражених плаценти. (205–207) Будући да је питање директне трансмисије и даље тама научних недоумица, у тежњи да се смањи погрешна класификација панел група експерата донела је прву стандардну дефиницију активне инфекције. Према овој дефиницији дефинитивни доказ плацентне инфекције је присуство активне репликације SARS-COV-2 вируса унутар ћелија плаценте. Према овој дефиницији детекција вирусне

RNK или вирусних протеина унутар плацентног ткива указује само на могућност инфекције SARS-COV-2 те свакако фокус будућих истраживања која се буду бавила трансмисијом мора бити доказивање активне репликације. (208)

5.8. Анализа експресије CD68+ макрофага унутар постепљичног ткива пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће.

Извршили имунохистохемијску анализу експресије CD68+ леукоцита у ради доказивања инфламационих промена унутар постепљиче.

Наша студија показала је статистички значајну разлику у експресији CD68+ макрофага унутар постепљичног ткива код пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу. Међу подгрупама издвојеним у односу на клиничку слику или триместар у коме се десила инфекција није било статистички значајних разлика. Наша студија је поред Хофбауерових ћелија уочила и присуство имунореактивности у интервилозном простору што указује на постојање хистиоцитног интервилитиса. Раније имунохистохемијске студије показале су интензивно бојење CD68+ маркером на нивоу интервилозних простора што указује на постојање хистиоцитног интервилитиса заражених пацијенткиња SARS-COV-2 вирусом, који би требало раздвојити од детектованих Хофбарових ћелија феталног порекла које су такође CD68 позитивне. (209) Хронични хистиоцитни интервилитис карактерише инфилтрација бар 5% интервилозног простора матерналним CD68 ћелијама у одсуству других знакова запања а перинатални исход је у корелацији са степеном инфилтрације. (210–213)

Будуће студије требале би да узму у разматрање додатно диферентовање инфламаторних ћелија помоћу имунохистохемијских маркера у смислу одређивања присуства макрофага, моноцита, неутрофила и евентуално одређивања њиховог активисаног стања.

Додатно смо испитивали повезаности експресије CD68+ макрофага у ткиву постепљиче са биомаркерима оксидативног стреса мајки и новорођенчади. Резултати теста показали су позитивну корелацију TBARSa како у серуму мајке, тако и у серуму плода са експресијом CD68+ биомаркера у ткиву постепљиче. Овај податак води нас ка закључку да испитивање имунореактивности на CD68+ антиген унутар постепљичног ткива има значајну улогу у идентификацији новорођенчади са могућим раним или одложеним компликацијама насталим под утицајем оксидативног стреса и инфламације.

5.9. Параметри ОС трудница оболелих од COVID-19 у односу на налаз хистопатолошких промена постепљичног ткива

На основу искустава претходних студија које су се бавиле испитивањем поремећаја оксидативне равнотеже и утицаја на морфоанатомске промене у постепљичи, најчешће код прееклампсије, (214) тестирали смо повезаност појединачних патохистолошких налаза постепљичног ткива пацијенткиња оболелих од SARS-COV-2 са нивоом биомаркера оксидативног стреса мајке и новорођенчета. Резултати наше студије показали су да је ниво TBARSa новорођенчета значајно био повишен код трудница са налазом васкуларних ресица унутар постепљичног ткива, као и облитерацијом крвних судова постепљиче, док ниво TBARSa мајке позитивно корелира са налазима васкуларне екстазије крвних судова постепљиче као и инфаркта постепљиче. Ови налази су у сагласности са подацима из литературе који говоре у прилог повишеним нивоима биомаркера липидне пероксидације код пацијенткиња са васкуларним и инфламаторним променама постепљичног ткива. (85,214–216)

Ниво каталазе мајке у позитивној је корелацији са постојањем ретроплацентног хематома, а ниво NO₂⁻ плода је у позитивној корелацији са постојањем FVM промена

Налази наше студије у сагласности су са подацима из литературе који говоре у прилог развоја компензаторних механизма антиоксидативне заштите у циљу балансирања побуђеног оксидативног стреса посредством дејства инфекције. (82,87)

5.10 Корелација позитивног налаза IgM антитела на SARS COV2 код новорођенчади са биомаркерима оксидативног стреса мајке

Наша студија детектовала је повезаност налаза IgM антитела на SARS-COV-2 код новорођенчади са повишеним нивоом TBARSa, биомаркера оксидативног стреса мајке. Овај налаз у сагласности је са ставом ранијих студија да интактна постељица представља баријеру пропагацији SARS-COV-2 на плод, међутим инфламаторне промене и оксидативни стрес погодују директној трансмисији. (180) Додатно, претходно је уочена повезаност нивоа TBARSa у серуму мајке са експресијом Spike протеина у постељичном ткиву што додатно указује на могућност директне трасмисије SARS-COV-2 са мајке на плод и даје значај TBARSu мајке као потенцијално вредном биомаркеру у детекцији ових високоризичних трудноћа. TBARS плода није корелирао са овим налазима што говори у прилог адаптивној антиоксидативној функцији постељице и компензаторном развоју ензима антиоксидативне одбране новорођенчета. (217) SOD који има значајну улогу у детоксикацији оксидативног стреса био значајно повишен у групи SARS-COV-2+ мајки, што је утицало и на смањење ниво TBARSa новорођенчета.

5. ЗАКЉУЧЦИ

6.1. Примарни закључци

На основу анализе добијених резултата приказаних у овој докторској дисертацији дошли смо до следећих закључака:

1. Типови и учесталост патохистолошких промена унутар постеличног ткива код пацијенткиња које су имале потврђену SARS-COV-2 инфекцију током трудноће разликује се значајно у односу на контролну групу. FVM су значајно статистички учесталији тип плацентне лезије унутар групе пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће. У односу на специфичне ентитете патолошких плацентних лезија постоји статистички значајно учесталија испољеност васкуларних екстазија, облитерације крвних судова и аваскуларних ресица код пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће.
2. На основу разлике у концентрацији SARS-COV-2 IgM антитела у крви новорођенчади у првом дану, као и израженог експримирања имунореактивности на Spike протеин у постеличном ткиву у групи SARS-COV-2 позитивних трудница закључујемо да је директна трансмисија са мајке на плод могућа. За дефинитивну потврду директне трансмисије неопходно је обавити додатна истраживања у циљу доказивања активне репликације вируса у хелијама трофобласта.
3. Вредности нивоа биомаркера оксидативног стреса као и антиоксидативне заштите значајно се разликују код пацијенткиња и новорођенчади SARS-COV-2 позитивне и негативне групе. Индекс липидне пероксидације мерен као TBARS, нитрити (NO_2^-), супероксидни анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2), супероксид дизмутаза (SOD) као и редуковани глутатион (GSH) значајно су се разликовали између узорака мајке и новорођенчади SARS-COV-2+ и негативне групе. T-BARS има значај као потенцијални биомаркер оксидативног стреса насталог као последица SARS-COV-2 инфекције у трудноћи и оштећења плацентног ткива. TBARS би могао имати значај у идентификовању високоризичних SARS-COV-2 трудноћа које захтевају посебну пажњу приликом праћења, порођаја и неонаталне неге. Вредности осталих биомаркера оксидативног стреса и антиоксидативне заштите које су се значајно разликовале међу групама вероватно су под утицајем начина завршавања трудноће и способности постелице да балансира новонастали оксидативни стрес под утицајем вируса активирањем компензаторних антиоксидативних механизма.
4. NO (мерен посредно као NO_2^-), код мајке је био значајно повишен подгрупи трудница са тежом клиничком сликом те може имати вредност у идентификовању трудница са високим ризиком за настанак компликација SARS-COV-2 током трудноће.
5. TBARSа новорођенчета значајно био повишен код трудница са налазом аваскуларних ресица унутар постеличног ткива, као и облитерацијом крвних судова постелице, док ниво TBARSа мајке позитивно корелира са налазима васкуларне екстазије крвних судова постелице као и инфаркта постелице.
6. Ниво каталазе мајке у позитивној је корелацији са постојањем ретроплацентног хематома, а ниво NO_2^- плода је у позитивној корелацији са постојањем FVM промена.
7. Новорођенчад мајки са потврђеном SARS-COV-2 инфекцијом током трудноће имала су забележен дужи боравак на одељењу интензивне неге

новорођенчади, док су новорођенчад трудница из подгрупе са тежом клиничком сликом забележила дужи временски период хоспитализације поред боравка на интензивној неонаталној нези. Закључили смо да је неопходан мултидисциплинарни приступ у праћењу ових високоризичних трудноћа. Неопходно је да болнице које се баве збрињавањем SARS-COV-2 позитивних трудница унутар своје организације поседују и јединицу интензивне неге новорођенчади са адекватним капацитетима за збрињавање ове новорођенчади.

8. Параметри неонаталног исхода: Апгар скор, телесне мере новорођенчади, дужина хоспитализације, тежина постељице, обим пресека пупчаника -не разликују се између новорођенчади мајки инфицираних SARS-COV-2 и контролне групе.
9. Постоји позитивна корелација степена експресије ACE2 рецептора у ткиву постељице са повишеном концентрацијом O₂- анјона у крви мајке што говори у прилог томе да су пацијенткиње са повишеном експресијом ACE2 рецептора подложније настанку оксидативног стреса и потенцијалних компликација COVID-19.
10. Постоји значајна разлика у експресији CD68+ макрофага унутар постелјичног ткива код пацијенткиња инфицираних SARS-COV-2 током трудноће у односу на контролну групу. Поред CD68+ Хофбауерових ћелија детектовано је и присуство имунореактивности у интервилу простору што указује на интервилусни хистиоцитис-редак патолошки ентитет а високим ризиком за настанак лошег исхода трудноће и неонаталних компликација.

6.2. Секундарни закључци

1. Труднице са потврђеном SARS-COV-2 инфекцијом током трудноће немају повишен обстетрички ризик за оперативно или инструментално завршавање порођаја.
2. Пацијенткиње са тежом клиничком сликом COVID-19 имају повишен ризик од оперативног завршавања порођаја.
3. Недеља у којој је мајка заражена COVID-19 у позитивној је корелацији са масом постељице и односом масе постељице и телесне масе новорођенчета. Што се раније деси инфекција током трудноће то виши ризик од настанка метаболичких неонаталних компликација.
4. Наша студија је показала да међу подгрупама SARS-COV-2 групе трудница формираним у односу на триместар у коме се догодила инфекција и у односу на клиничку слику није било значајних статистичких разлика у учесталости испољавања патохистолошких лезија постељице.
5. Патохистолошки налаз постелјичног ткива морао би бити доступан како гинекологу тако и педијатру ради идентификације новорођенчади са повишеним ризиком од настанка непосредних и одложених развојних компликација.
6. Позитивна корелација између нивоа TBARS у серуму мајке са степеном имунореактивности на Spike протеин унутар постелјичног истиче значај TBARS-а као потенцијалног биомаркера оксидативног стреса у идентификацији пацијенткиња са могућом директном трансмисијом на плод и високим ризиком за настанак компликација у трудноћи и неонаталном периоду.

7. Повезаности експресије CD68+ макрофага у ткиву постељице са TBARSa како у серуму мајке, тако и у серуму плода указује на значај ове ИХХ анализе код мајки заражених SARS-COV-2 у идентификацији новорођенчади са могућим настанком раних или одложених компликација под утицајем оксидативног стреса и инфламације.
8. Експресије Spike протеина у постељичном ткиву повезана је са боравком новорођенчета на интензивној неонаталној нези те је ИХХ анализа имунореактивности на Spike антиген значајна у откривању новорођенчади са ризиком за настанак раних неонаталних и касних развојних компликација.
9. Обзиром на потенцијални настанак одложених последице код новорођенчади чије су мајке биле заражене SARS-COV-2 током трудноће неопходно је интензивно праћење од стране педијатра не само кроз неонатални период већ и кроз детињство у циљу контроле неуролошког развоја.
10. Будуће студије које се буду бавиле испитивањем промена плацентног ткива у зависности од COVID-19 требало би да детерминишу подваријанту вируса којом је пацијенткиња била заражена, јер је доказано да подваријанте SARS-COV-2 поседују различит потенцијал за настанак плацентних лезија и утицаја на матернални и неонатални исход.
11. Важан утицај на потенцијалне патолошке промене унутар постељице и исход трудноће у вези су са вакциналним статусом пацијенткиња те би будуће студије морале би да узму у обзир вакцинални статус пацијенткиња.
12. Експресија CD68+ повезана је са експресијом Spike протеина унутар постељичног ткива што указује на то да инфламаторне промене у постељници погодују директној трансмисији.

Ограничења наше студије су мали број испитаница и чињеница да студија није спроведена као дупло слепа за те се не може искључити потенцијална пристрасност истраживача. Снага студије лежи у елиминисању великог броја збуњујућих фактора.

6. ЛІТЕРАТУРА

1. Lu H, Stratton CW, Tang Y. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol*. 2020 Apr 12;92(4):401–2.
2. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2020 Mar 26;382(13):1199–207.
3. Schwartz DA, Morotti D, Beigi B, Moshfegh F, Zafaranloo N, Patanè L. Confirming Vertical Fetal Infection With Coronavirus Disease 2019: Neonatal and Pathology Criteria for Early Onset and Transplacental Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Infected Pregnant Mothers. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 Dec 1;144(12):1451–6.
4. Zhu Y, Sharma L, Chang D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Front Immunol*. 2023 Aug 14;14.
5. Number of COVID-19 cases reported to WHO (cumulative total) World [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 16]. Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
6. Wastnedge EAN, Reynolds RM, van Boeckel SR, Stock SJ, Denison FC, Maybin JA, et al. Pregnancy and COVID-19. *Physiol Rev*. 2021 Jan 1;101(1):303–18.
7. Sher L. The impact of the COVID-19 pandemic on suicide rates. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2020 Oct 1;113(10):707–12.
8. Dang A, Thakker R, Li S, Hommel E, Mehta HB, Goodwin JS. Hospitalizations and Mortality From Non–SARS-CoV-2 Causes Among Medicare Beneficiaries at US Hospitals During the SARS-CoV-2 Pandemic. *JAMA Netw Open*. 2022 Mar 9;5(3):e221754.
9. Macáková K, Pšenková P, Šupčíková N, Vlková B, Celec P, Záhumenský J. Effect of SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Vaccination on Oxidative Status of Human Placenta: A Preliminary Study. *Antioxidants*. 2023 Jul 9;12(7):1403.
10. CDC Weekly C. Protocol for Prevention and Control of COVID-19 (Edition 6). *China CDC Wkly*. 2020;2(19):321–6.
11. Asselah T, Durantel D, Pasmant E, Lau G, Schinazi RF. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J Hepatol*. 2021 Jan;74(1):168–84.
12. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun* [Internet]. 2022;13(1):4399. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32019-3>
13. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* [Internet]. 2020 Apr 16;181(2):271–280.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>

14. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260–3.
15. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020 Mar 27;367(6485):1444–8.
16. D’Souza R, Malhamé I, Teshler L, Acharya G, Hunt BJ, McLintock C. A critical review of the pathophysiology of thrombotic complications and clinical practice recommendations for thromboprophylaxis in pregnant patients with COVID-19. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2020;99(9):1110–20. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/aogs.13962>
17. Sardu C, Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Marfella R, Santulli G. Hypertension, Thrombosis, Kidney Failure, and Diabetes: Is COVID-19 an Endothelial Disease? A Comprehensive Evaluation of Clinical and Basic Evidence. *J Clin Med*. 2020 May 11;9(5).
18. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCoV. *bioRxiv* [Internet]. 2020; Available from: <https://www.biorxiv.org/content/early/2020/01/26/2020.01.26.919985>
19. Xiong TY, Redwood S, Prendergast B, Chen M. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications. *Eur Heart J*. 2020 May 14;41(19):1798–800.
20. Middeldorp S, Coppens M, van Haaps TF, Foppen M, Vlaar AP, Müller MCA, et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Aug;18(8):1995–2002.
21. Ranucci M, Ballotta A, Di Dedda U, Baryshnikova E, Dei Poli M, Resta M, et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Jul;18(7):1747–51.
22. Barrett CD, Moore HB, Yaffe MB, Moore EE. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19: A comment. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Aug;18(8):2060–3.
23. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020 Jul;191:145–7.
24. Llitjos J, Leclerc M, Chochois C, Monsallier J, Ramakers M, Auvray M, et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Jul;18(7):1743–6.
25. Yoshida M, Worlock KB, Huang N, Lindeboom RGH, Butler CR, Kumasaka N, et al. Local and systemic responses to SARS-CoV-2 infection in children and adults. *Nature*. 2022 Feb 10;602(7896):321–7.

26. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol.* 2021 Apr 3;93(4).
27. ⁸ Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. *Postgrad Med J.* 2021 May 1;97(1147):312–20.
28. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med.* 2020 May 1;26(5):672–5.
29. Ganyani T, Kremer C, Chen D, Torneri A, Faes C, Wallinga J, et al. Estimating the generation interval for coronavirus disease (COVID-19) based on symptom onset data, March 2020. *Eurosurveillance.* 2020 Apr 30;25(17).
30. Leisman DE, Deutschman CS, Legrand M. Facing COVID-19 in the ICU: vascular dysfunction, thrombosis, and dysregulated inflammation. *Intensive Care Med.* 2020 Jun 28;46(6):1105–8.
31. Chan JFW, To KKW, Tse H, Jin DY, Yuen KY. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends Microbiol.* 2013 Oct;21(10):544–55.
32. Zu ZY, Jiang M Di, Xu PP, Chen W, Ni QQ, Lu GM, et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Perspective from China. *Radiology.* 2020 Aug;296(2):E15–25.
33. ⁸ Wastnedge EAN, Reynolds RM, van Boeckel SR, Stock SJ, Denison FC, Maybin JA, et al. Pregnancy and COVID-19. *Physiol Rev.* 2021 Jan 1;101(1):303–18.
34. Di Mascio D, Khalil A, Saccone G, Rizzo G, Buca D, Liberati M, et al. Outcome of coronavirus spectrum infections (SARS, MERS, COVID-19) during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol MFM.* 2020 May;2(2):100107.
35. Menter T, Mertz KD, Jiang S, Chen H, Monod C, Tzankov A, et al. Placental Pathology Findings during and after SARS-CoV-2 Infection: Features of Villitis and Malperfusion. *Pathobiology.* 2021;88(1):69–77.
36. Lapinsky S. Management of Acute Respiratory Failure in Pregnancy. *Semin Respir Crit Care Med.* 2017 Apr 22;38(02):201–7.
37. Bende M, Gredmark T. Nasal Stuffiness During Pregnancy. *Laryngoscope.* 1999 Jul 20;109(7):1108–10.
38. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Mar 14;1221(1):80–7.
39. Liu H, Wang LL, Zhao SJ, Kwak-Kim J, Mor G, Liao AH. Why are pregnant women susceptible to COVID-19? An immunological viewpoint. *J Reprod Immunol.* 2020 Jun 1;139:103122.

40. Falahi S, Abdoli A, Kenarkoohi A. Maternal COVID-19 infection and the fetus: Immunological and neurological perspectives. *New Microbes New Infect.* 2023 Jun;53:101135.
41. Thornton P, Douglas J. Coagulation in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010 Jun 1;24(3):339–52.
42. Varlas VN, Borş RG, Plotogea M, Iordache M, Mehedinţu C, Cîrstoiu MM. Thromboprophylaxis in Pregnant Women with COVID-19: An Unsolved Issue. *Int J Environ Res Public Health.* 2023 Jan 20;20(3):1949.
43. Frantzeskaki F, Armaganidis A, Orfanos SE. Immunothrombosis in Acute Respiratory Distress Syndrome: Cross Talks between Inflammation and Coagulation. *Respiration.* 2017;93(3):212–25.
44. Zhao X, Jiang Y, Zhao Y, Xi H, Liu C, Qu F, et al. Analysis of the susceptibility to COVID-19 in pregnancy and recommendations on potential drug screening. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2020 Jul 23;39(7):1209–20.
45. Levy A, Yagil Y, Bursztyn M, Barkalifa R, Scharf S, Yagil C. ACE2 expression and activity are enhanced during pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2008 Dec;295(6):R1953–61.
46. Joyner J, Neves LAA, Granger JP, Alexander BT, Merrill DC, Chappell MC, et al. Temporal-spatial expression of ANG-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2007 Jul;293(1):R169–77.
47. Brosnihan KB, Neves LAA, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004 Aug;37(8):1255–62.
48. Gomez-Lopez N, Romero R, Escobar MF, Carvajal JA, Echavarria MP, Albornoz LL, et al. Pregnancy-specific responses to COVID-19 revealed by high-throughput proteomics of human plasma. *Communications Medicine.* 2023 Apr 4;3(1):48.
49. Lim MJ, Lakshminrusimha S, Hedriana H, Albertson T. Pregnancy and Severe ARDS with COVID-19: Epidemiology, Diagnosis, Outcomes and Treatment. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2023 Feb;28(1):101426.
50. Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in Normal and Preeclamptic Pregnancy. *Endocrine.* 2002;18(3):239–46.
51. West CA, Sasser JM, Baylis C. The enigma of continual plasma volume expansion in pregnancy: critical role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2016 Dec 1;311(6):F1125–34.
52. Brosnihan KB, Neves LAA, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004 Aug;37(8):1255–62.

53. Azinheira Nobrega Cruz N, Stoll D, Casarini DE, Bertagnolli M. Role of ACE2 in pregnancy and potential implications for COVID-19 susceptibility. *Clin Sci*. 2021 Aug 13;135(15):1805–24.
- 8
54. Bloise E, Zhang J, Nakpu J, Hamada H, Dunk CE, Li S, et al. Expression of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 cell entry genes, angiotensin-converting enzyme 2 and transmembrane protease serine 2, in the placenta across gestation and at the maternal-fetal interface in pregnancies complicated by preterm birth or preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2021 Mar;224(3):298.e1-298.e8.
55. Pique-Regi R, Romero R, Tarca AL, Luca F, Xu Y, Alazizi A, et al. Does the human placenta express the canonical cell entry mediators for SARS-CoV-2? *Elife*. 2020 Jul 14;9.
56. Valdés G, Neves LAA, Anton L, Corthorn J, Chacón C, Germain AM, et al. Distribution of Angiotensin-(1-7) and ACE2 in Human Placentas of Normal and Pathological Pregnancies. *Placenta*. 2006 Feb 1;27(2–3):200–7.
57. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) in regulation of cardiovascular function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005 Dec;289(6):H2281–90.
58. Narang K, Enninga EAL, Gunaratne MDSK, Ibirogbra ER, Trad ATA, Elrefaei A, et al. SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 During Pregnancy: A Multidisciplinary Review. *Mayo Clin Proc*. 2020 Aug 1;95(8):1750–65.
59. Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Muench MO, et al. Differential Downregulation of ACE2 by the Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Human Coronavirus NL63. *J Virol*. 2010 Jan 15;84(2):1198–205.
60. Ghadhanfar E, Alsalem A, Al-Kandari S, Naser J, Babiker F, Al-Bader M. The role of ACE2, angiotensin-(1–7) and Mas1 receptor axis in glucocorticoid-induced intrauterine growth restriction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017 Dec 29;15(1):97.
61. Bharadwaj MS, Strawn WB, Groban L, Yamaleyeva LM, Chappell MC, Horta C, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Deficiency Is Associated With Impaired Gestational Weight Gain and Fetal Growth Restriction. *Hypertension*. 2011 Nov;58(5):852–8.
62. Tamanna S, Clifton VL, Rae K, van Helden DF, Lumbers ER, Pringle KG. Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) in Pregnancy: Preeclampsia and Small for Gestational Age. *Front Physiol*. 2020 Sep 30;11.
- 9
63. Chen G, Zhang Y, Zhang Y, Ai J, Yang B, Cui M, et al. Differential immune responses in pregnant patients recovered from COVID-19. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jul 29;6(1):289.
64. Chen G, Liao Q, Ai J, Yang B, Bai H, Chen J, et al. Immune Response to COVID-19 During Pregnancy. *Front Immunol*. 2021 May 3;12.

65. De Biasi S, Tartaro D Lo, Gibellini L, Paolini A, Quong A, Petes C, et al. Endogenous control of inflammation characterizes pregnant women with asymptomatic or paucisymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2021 Jul 29;12(1):4677.
66. Muthuka J, Kiptoo M, Oluoch K, Nzioki JM, Nyamai EM. Association of Pregnancy With Coronavirus Cytokine Storm: Systematic Review and Meta-analysis. *JMIR Pediatr Parent*. 2022 Oct 4;5(4):e31579.
67. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2017 Aug 19;17(8):469–82.
68. Chi H, Chiu NC, Tai YL, Chang HY, Lin CH, Sung YH, et al. Clinical features of neonates born to mothers with coronavirus disease-2019: A systematic review of 105 neonates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2021 Feb 1;54(1):69–76.
69. Martin MA, Keith M, Pace RM, Williams JE, Ley SH, Barbosa-Leiker C, et al. SARS-CoV-2 specific antibody trajectories in mothers and infants over two months following maternal infection. *Front Immunol*. 2022 Oct 12;13.
70. Flannery DD, Gouma S, Dhudasia MB, Mukhopadhyay S, Pfeifer MR, Woodford EC, et al. Assessment of Maternal and Neonatal Cord Blood SARS-CoV-2 Antibodies and Placental Transfer Ratios. *JAMA Pediatr*. 2021 Jun 1;175(6):594.
71. Lamouroux A, Attie-Bitach T, Martinovic J, Leruez-Ville M, Ville Y. Evidence for and against vertical transmission for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 Jul;223(1):91.e1-91.e4.
72. Sies H, Berndt C, Jones DP. *Oxidative Stress*. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86(1):715–48.
73. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015 Apr;4:180–3.
74. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*. 2020 Sep 10;9(9):852.
75. M DrC, D C DrM, Johnson DrP. Oxidative stress during spontaneous vaginal delivery: comparison between maternal and neonatal oxidative status. *International Journal of Medical Research and Review*. 2016 Jan 31;4(1):60–6.
76. Marín R, Abad C, Rojas D, Chiarello DI, Alejandro TG. Biomarkers of oxidative stress and reproductive complications. *Adv Clin Chem*. 2023 Jan 1;113:157–233.
77. Simon-szabo Z, Fogarasi E, Nemes-Nagy E, Denes L, Croitoru M, Szabo B. Oxidative stress and peripartum outcomes (Review). *Exp Ther Med*. 2021 May 17;22(1):771.
78. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000 Dec 1;29(11):1106–14.
79. Perrone S, Laschi E, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radic Biol Med*. 2019 Oct;142:23–31.

80. Fogarasi E, Croitoru MD, Fülöp I, Muntean DL. Is the Oxidative Stress Really a Disease? *Acta Med Marisiensis*. 2016 Mar 1;62(1):112–20.
81. 2brahim A, Khoo MI, Ismail EHE, Hussain NHN, Zin AAM, Noordin L, et al. Oxidative stress biomarkers in pregnancy: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2024 Aug 2;22(1):93.
82. Schoots MH, Gordijn SJ, Scherjon SA, van Goor H, Hillebrands JL. Oxidative stress in placental pathology. *Placenta*. 2018 Sep;69:153–61.
83. 5Holwerda KM, Faas MM, van Goor H, Lely AT. Gasotransmitters. *Hypertension*. 2013 Oct;62(4):653–9.
84. 5Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online*. 2003 Jan 1;6(1):84–96.
85. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic Oxidative Stress in Relation to Temporal and Regional Differences in Maternal Placental Blood Flow in Normal and Abnormal Early Pregnancies. *Am J Pathol*. 2003 Jan 1;162(1):115–25.
86. Jauniaux E, Zaidi J, Jurkovic D, Campbell S, Hustin J. Pregnancy: Comparison of colour Doppler features and pathological findings in complicated early pregnancy. *Human Reproduction*. 1994 Dec;9(12):2432–7.
87. 5Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress: A Possible Factor in Human Early Pregnancy Failure. *Am J Pathol*. 2000 Dec 1;157(6):2111–22.
88. 5Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online*. 2003 Jan 1;6(1):84–96.
89. 5Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ. Changes in concentration, localization and activity of catalase within the human placenta during early gestation. *Placenta*. 1998 Jan 1;19(1):27–34.
90. 5Hung TH, Skepper JN, Burton GJ. In Vitro Ischemia-Reperfusion Injury in Term Human Placenta as a Model for Oxidative Stress in Pathological Pregnancies. *Am J Pathol*. 2001 Sep 1;159(3):1031–43.
91. Fogel I, Pinchuk I, Kupferminc MJ, Lichtenberg D, Fainaru O. Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on mode of delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Jul;193(1):241–6.
92. 1Hracsko Z, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS. Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section. *In Vivo*. 2007;21(4):703–6.
93. 6Chiba T, Omori A, Takahashi K, Tanaka K, Kudo K, Manabe M, et al. Correlations between the detection of stress-associated hormone/oxidative stress markers in umbilical cord blood and the physical condition of the mother and neonate. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2010 Oct 30;36(5):958–64.

94. Karaçor T, Sak S, Başaranoğlu S, Peker N, Ağaçayak E, Sak ME, et al. ⁶ Assessment of oxidative stress markers in cord blood of newborns to patients with oxytocin-induced labor. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2017 May 18;43(5):860–5.
95. Basu J, Bendek B, Agamasu E, Salafia CM, Mishra A, Benfield N, et al. ² Placental Oxidative Status throughout Normal Gestation in Women with Uncomplicated Pregnancies. *Obstet Gynecol Int*. 2015;2015:1–6.
96. ² Draganovic D, Lucic N, Jojic D. Oxidative Stress Marker and Pregnancy Induced Hypertension. *Medical Archives*. 2016;70(6):437.
97. ² Toy H, Camuzcuoglu H, Camuzcuoglu A, Celik H, Aksoy N. Decreased Serum Prolidase Activity and Increased Oxidative Stress in Early Pregnancy Loss. *Gynecol Obstet Invest*. 2010;69(2):122–7.
98. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative <scp>DNA</scp> damage related to occupational and environmental exposures [<scp>BAT</scp> Value Documentation, 2010]. In: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. Wiley; 2016. p. 1–24.
99. ² Biberoglu E, Biberoglu K, Kirbas A, Daglar K, Genc M, Avci A, et al. Circulating and myometrial markers of oxidative stress in pregnant women with fetal growth restriction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2016 Jan 10;42(1):29–35.
100. ² Li H, Yin Q, Li N, Ouyang Z, Zhong M. Plasma Markers of Oxidative Stress in Patients with Gestational Diabetes Mellitus in the Second and Third Trimester. *Obstet Gynecol Int*. 2016;2016:1–8.
101. ² Dessordi R. ASSESSMENT OF THYROID FUNCTION, IODURIA AND OXIDATIVE STRESS IN PREGNANT WOMEN. *Nutr Hosp*. 2018 Oct 17;
102. ² Kurlak LO, Scaife PJ, Briggs L V., Broughton Pipkin F, Gardner DS, Mistry HD. Alterations in Antioxidant Micronutrient Concentrations in Placental Tissue, Maternal Blood and Urine and the Fetal Circulation in Pre-eclampsia. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 10;24(4):3579.
103. ² Kurlak LO, Green A, Loughna P, Broughton Pipkin F. Oxidative stress markers in hypertensive states of pregnancy: preterm and term disease. *Front Physiol*. 2014 Aug 25;5.
104. ² Zhang H, Luo Q, Hu C, Song Q, Zhou Y, Su X, et al. Trimester-specific exposure to triclocarban during pregnancy: Associations with oxidative stress and size at birth. *Science of The Total Environment*. 2024 Jan;907:168100.
105. ² López-Tinoco C, Roca M, García-Valero A, Murri M, Tinahones FJ, Segundo C, et al. Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2013 Apr 17;50(2):201–8.
106. Hamzaoglu Canbolat K, Öncül M, Özel A, Alıcı Davutoğlu E, Kaymak D, Bulut H, et al. Oxidative stress and antioxidant status in threatened preterm labor. *Arch Gynecol Obstet*. 2023 Apr 1;309(4):1395–400.

107. ² Cakina S, Pek E, Ozkavak O, Kocyigit D, Beyazit F. The role of paraoxonase and myeloperoxidase as oxidative stress markers in pregnant women with hypothyroidism. *Gynecological Endocrinology*. 2022 Oct 3;38(10):840–3.
108. ⁹ Suhren JT, Meinardus A, Hussein K, Schaumann N. Meta-analysis on COVID-19-pregnancy-related placental pathologies shows no specific pattern. *Placenta*. 2022 Jan;117:72–7.
109. ³ Levitan D, London V, McLaren RA, Mann JD, Cheng K, Silver M, et al. Histologic and Immunohistochemical Evaluation of 65 Placentas From Women With Polymerase Chain Reaction–Proven Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2021 Jun 1;145(6):648–56.
110. Al-Rawaf SA, Mousa ET, Kareem NM. Correlation between Pregnancy Outcome and Placental Pathology in COVID-19 Pregnant Women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2022 Aug 21;2022:1–5.
111. ¹ Nascimento ACM, Avvad-Portari E, Meuser-Batista M, Conde TC, de Sá RAM, Salomao N, et al. Histopathological and clinical analysis of COVID-19-infected placentas. *Surgical and Experimental Pathology*. 2024 Apr 7;7(1):4.
112. Baergen RN, Heller DS. Placental Pathology in Covid-19 Positive Mothers: Preliminary Findings. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2020 Jun 12;23(3):177–80.
113. Hosier H, Farhadian SF, Morotti RA, Deshmukh U, Lu-Culligan A, Campbell KH, et al. SARS–CoV-2 infection of the placenta. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Aug 17;130(9):4947–53.
114. Smithgall MC, Liu-Jarin X, Hamele-Bena D, Cimic A, Mourad M, Debelenko L, et al. Third-trimester placentas of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-positive women: histomorphology, including viral immunohistochemistry and *in-situ* hybridization. *Histopathology*. 2020 Dec 26;77(6):994–9.
115. Glynn SM, Yang YJ, Thomas C, Friedlander RL, Cagino KA, Matthews KC, et al. SARS-CoV-2 and Placental Pathology. *American Journal of Surgical Pathology*. 2022 Jan;46(1):51–7.
116. Prabhu M, Cagino K, Matthews K, Friedlander R, Glynn S, Kubiak J, et al. Pregnancy and postpartum outcomes in a universally tested population for SARS-CoV-2 in New York City: a prospective cohort study. *BJOG*. 2020 Nov 13;127(12):1548–56.
117. Mulvey JJ, Magro CM, Ma LX, Nuovo GJ, Baergen RN. Analysis of complement deposition and viral RNA in placentas of COVID-19 patients. *Ann Diagn Pathol*. 2020 Jun;46:151530.
118. Patberg ET, Adams T, Rekawek P, Vahanian SA, Akerman M, Hernandez A, et al. Coronavirus disease 2019 infection and placental histopathology in women delivering at term. *Am J Obstet Gynecol*. 2021 Apr 1;224(4):382.e1–382.e18.
119. Shanes ED, Mithal LB, Otero S, Azad HA, Miller ES, Goldstein JA. Placental Pathology in COVID-19. *Am J Clin Pathol*. 2020 Jun 8;154(1):23–32.

120. Hsu AL, Guan M, Johannesen E, Stephens AJ, Khaleel N, Kagan N, et al. Placental SARS-CoV-2 in a pregnant woman with mild COVID-19 disease. *J Med Virol*. 2021 Feb 10;93(2):1038–44.
121. Corbetta-Rastelli CM, Altendahl M, Gasper C, Goldstein JD, Afshar Y, Gaw SL. Analysis of placental pathology after COVID-19 by timing and severity of infection. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2023 Jul;5(7):100981.
122. Parks WT, Catov JM. The Placenta as a Window to Maternal Vascular Health. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2020 Mar;47(1):17–28.
123. Ernst LM. Maternal vascular malperfusion of the placental bed. *APMIS*. 2018 Jul 24;126(7):551–60.
124. Sharps MC, Hayes DJL, Lee S, Zou Z, Brady CA, Almoghrahi Y, et al. A structured review of placental morphology and histopathological lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Placenta*. 2020 Nov;101:13–29.
125. Lista G, Castoldi F, Compagnoni G, Maggioni C, Cornélissen G, Halberg F. Neonatal and maternal concentrations of hydroxyl radical and total antioxidant system: protective role of placenta against fetal oxidative stress. *Neuro Endocrinol Lett*. 2010;31(3):319–24.
126. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NCM, Boyd TK, Brundler MA, et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med*. 2016 Jul;140(7):698–713.
127. Roberts DJ, Post MD. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *J Clin Pathol*. 2008 Dec;61(12):1254–60.
128. Chisholm KM, Heerema-McKenney A. Fetal Thrombotic Vasculopathy. *American Journal of Surgical Pathology*. 2015 Feb;39(2):274–80.
129. Redline RW. Clinical and pathological umbilical cord abnormalities in fetal thrombotic vasculopathy. *Hum Pathol*. 2004 Dec 1;35(12):1494–8.
130. Redline RW, Ariel I, Baergen RN, deSa DJ, Kraus FT, Roberts DJ, et al. Fetal Vascular Obstructive Lesions: Nosology and Reproducibility of Placental Reaction Patterns. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2004 Sep 1;7(5):443–52.
131. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NCM, Boyd TK, Brundler MA, et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med*. 2016 Jul;140(7):698–713.
132. Milot C, Koch A, Averous G, Mayeur S, Deruelle P. Development of placental lesions after recovery from COVID-19 during pregnancy: case-control study. *BJOG*. 2023 Jul 2;130(8):949–58.
133. Derricott H, Jones RL, Greenwood SL, Batra G, Evans MJ, Heazell AEP. Characterizing Villitis of Unknown Etiology and Inflammation in Stillbirth. *Am J Pathol*. 2016 Apr 1;186(4):952–61.

134. Shynlova O, Nadeem L, Zhang J, Dunk C, Lye S. Myometrial activation: Novel concepts underlying labor. *Placenta*. 2020 Mar 1;92:28–36.
135. Hamilton S, Oomomian Y, Stephen G, Shynlova O, Tower CL, Garrod A, et al. Macrophages Infiltrate the Human and Rat Decidua During Term and Preterm Labor: Evidence That Decidual Inflammation Precedes Labor. *Biol Reprod*. 2012 Feb 1;86(2).
136. Lye P, Dunk CE, Zhang J, Wei Y, Nakpu J, Hamada H, et al. ACE2 Is Expressed in Immune Cells That Infiltrate the Placenta in Infection-Associated Preterm Birth. *Cells*. 2021 Jul 8;10(7):1724.
137. Krop J, van der Meeren LE, van der Hoorn MLP, Ijsselsteijn ME, Dijkstra KL, Kapsenberg H, et al. Identification of a unique intervillous cellular signature in chronic histiocytic intervillitis. *Placenta*. 2023 Aug 1;139:34–42.
138. Joerink M, Rindsjö E, Van Riel B, Alm J, Papadogiannakis N. Placental macrophage (Hofbauer cell) polarization is independent of maternal allergen-sensitization and presence of chorioamnionitis. *Placenta*. 2011 May 1;32(5):380–5.
139. Yavuz D, Balsak D, Ekin C, Tahaoglu AE, Togrul C, Görük N, et al. Expression of VEGF and CD68 in the Placenta of Gestational Diabetic Mothers (Immunohistochemistry and Ultrastructural Study). *International Journal of Morphology*. 2015 Jun;33(2):522–6.
140. Resta L, Vimercati A, Cazzato G, Fanelli M, Scarcella SV, Ingravallo G, et al. SARS-CoV-2, Placental Histopathology, Gravity of Infection and Immunopathology: Is There an Association? *Viruses*. 2022 Jun 18;14(6):1330.
141. Traeder J, Jonigk D, Feist H, Bröcker V, Länger F, Kreipe H, et al. Pathological characteristics of a series of rare chronic histiocytic intervillitis of the placenta. *Placenta*. 2010 Dec;31(12):1116–9.
142. Arts N, Schiffer V, Severens-Rijvers C, Bons J, Spaanderman M, Al-Nasiry S. Cumulative effect of maternal vascular malperfusion types in the placenta on adverse pregnancy outcomes. *Placenta*. 2022 Nov;129:43–50.
143. Wright E, Audette MC, Ye XY, Keating S, Hoffman B, Lye SJ, et al. Maternal Vascular Malperfusion and Adverse Perinatal Outcomes in Low-Risk Nulliparous Women. *Obstetrics & Gynecology*. 2017 Nov;130(5):1112–20.
144. Zur RL, Kingdom JC, Parks WT, Hobson SR. The Placental Basis of Fetal Growth Restriction. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2020 Mar 1;47(1):81–98.
145. Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, Papageorgiou A, Baschat AA, Baker PN, et al. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2016 Sep;48(3):333–9.
146. Caparros-Gonzalez RA, Pérez-Morente MA, Hueso-Montoro C, Álvarez-Serrano MA, de la Torre-Luque A. Congenital, Intrapartum and Postnatal Maternal-Fetal-Neonatal SARS-CoV-2 Infections: A Narrative Review. *Nutrients*. 2020 Nov 20;12(11):3570.

147. Heider A. Fetal Vascular Malperfusion. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 Nov 1;141(11):1484–9.
148. Mekinian A, Kolanska K, Cheloufi M, Coulomb A, Cohen J, Abisror N, et al. Chronic Villitis of unknown etiology (VUE): Obstetrical features, outcome and treatment. *J Reprod Immunol*. 2021 Nov;148:103438.
149. Smith-Jeffcoat SE, Mellis AM, Grijalva CG, Talbot HK, Schmitz J, Lutrick K, et al. SARS-CoV-2 Viral Shedding and Rapid Antigen Test Performance — Respiratory Virus Transmission Network, November 2022–May 2023. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2024 Apr 25;73(16):365–71.
150. Kissler SM, Fauver JR, Mack C, Olesen SW, Tai C, Shiue KY, et al. Viral dynamics of acute SARS-CoV-2 infection and applications to diagnostic and public health strategies. *PLoS Biol*. 2021 Jul 12;19(7):e3001333.
151. Polechová J, Johnson KD, Payne P, Crozier A, Beiglböck M, Plevka P, et al. SARS-CoV-2 rapid antigen tests provide benefits for epidemic control – observations from Austrian schools. *J Clin Epidemiol*. 2022 May;145:14–9.
152. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008 May;2008(5):pdb.prot4986.
153. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*. 2016 Nov 15;50(6):411–8.
154. Handbook Methods For Oxygen Radical Research. CRC Press; 2018.
155. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980 Nov;38(1–2):161–70.
156. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351–8.
157. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct;126(1):131–8.
158. Aebi H. [13] Catalase in vitro. In 1984. p. 121–6.
159. Beutler E. Red Blood Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods. In: Bergmeyer HV, E, editor. 2nd ed. New York: Grune and Stratton; 1975. p. 112–4.
160. Beutler E. Red cell metabolism : a manual of biochemical methods (3rd ed). beutler, editor. New York: Grune and Stratton; 1982. 105–105 p.
161. Yeagle KP, O'Brien JM, Curtin WM, Ural SH. Are gestational and type II diabetes mellitus associated with the Apgar scores of full-term neonates? *Int J Womens Health*. 2018 Oct;Volume 10:603–7.
162. Medeiros TK de S, Dobre M, da Silva DMB, Brateanu A, Baltatu OC, Campos LA. Intrapartum Fetal Heart Rate: A Possible Predictor of Neonatal Acidemia and APGAR Score. *Front Physiol*. 2018 Oct 22;9.

163. Montgomery KS. Apgar Scores: Examining the Long-term Significance. *Journal of Perinatal Education*. 2000 Jul 1;9(3):5–9.
164. Wubetu AD, Amare YE, Haile AB, Degu MW. Newborn Birth Weight and Associated Factors Among Mother-Neonate Pairs in Public Hospitals, North Wollo, Ethiopia. *Pediatric Health Med Ther*. 2021;12:111–8.
165. Sharps MC, Hayes DJL, Lee S, Zou Z, Brady CA, Almoghrabi Y, et al. A structured review of placental morphology and histopathological lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Placenta*. 2020 Nov;101:13–29.
166. Imanparast F, Hashemi B, Mokhtari F, Mohaghegh P, Azar FF, Mehvari F. The effect of mother's age on the neonatal cord serum's oxidative stress index and maternal and neonatal outcomes: a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2024 Jan 12;24(1):61.
167. Tsermpini EE, Glamočlija U, Ulucan-Karnak F, Redenšek Trampuž S, Dolžan V. Molecular Mechanisms Related to Responses to Oxidative Stress and Antioxidative Therapies in COVID-19: A Systematic Review. *Antioxidants*. 2022 Aug 19;11(8):1609.
168. Lage SL, Amaral EP, Hilligan KL, Laidlaw E, Rupert A, Namasivayan S, et al. Persistent Oxidative Stress and Inflammasome Activation in CD14highCD16– Monocytes From COVID-19 Patients. *Front Immunol*. 2022 Jan 14;12.
169. Dubucs C, Groussolles M, Ousselin J, Sartor A, Van Acker N, Vayssière C, et al. Severe placental lesions due to maternal SARS-CoV-2 infection associated to intrauterine fetal death. *Hum Pathol*. 2022 Mar;121:46–55.
170. Giaxi P, Maniatielli E, Vivilaki V. Evaluation of mode of delivery in pregnant women infected with COVID-19. *Eur J Midwifery*. 2020 Jul 2;4(July).
171. Liu H, Liu F, Li J, Zhang T, Wang D, Lan W. Clinical and CT imaging features of the COVID-19 pneumonia: Focus on pregnant women and children. *Journal of Infection*. 2020 May;80(5):e7–13.
172. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *The Lancet*. 2020 Mar;395(10226):809–15.
173. Miyamoto M, Perreand E, Mangione M, Patel M, Cojocaru L, Seung H, et al. Mode of Delivery in Patients with COVID-19. *Am J Obstet Gynecol*. 2022 Jan;226(1):S582–3.
174. Maranto M, Zaami S, Restivo V, Termini D, Gangemi A, Tumminello M, et al. Symptomatic COVID-19 in Pregnancy: Hospital Cohort Data between May 2020 and April 2021, Risk Factors and Medicolegal Implications. *Diagnostics*. 2023 Mar 7;13(6):1009.
175. Ockene MW, Russo SC, Lee H, Monthé-Drèze C, Stanley TL, Ma IL, et al. Accelerated Longitudinal Weight Gain Among Infants With In Utero COVID-19 Exposure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023 Sep 18;108(10):2579–88.

176. Radan AP, Baud D, Favre G, Papadia A, Surbek D, Baumann M, et al. Low placental weight and altered metabolic scaling after severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 infection during pregnancy: a prospective multicentric study. *Clin Microbiol Infect.* 2022 May;28(5):718–22.
177. Chao M, Menon C, Elgendi M. Validity of Apgar Score as an Indicator of Neonatal SARS-CoV-2 Infection: A Scoping Review. *Front Med (Lausanne).* 2022 Jan 11;8.
178. Riemma G, De Franciscis P, Tesorone M, Coppa E, Schiattarella A, Billone V, et al. Obstetric and Gynecological Admissions and Hospitalizations in an Italian Tertiary-Care Hospital during COVID-19 Pandemic: A Retrospective Analysis According to Restrictive Measures. *J Clin Med.* 2023 Nov 15;12(22):7097.
179. de Carvalho WB, Gibelli MABC, Krebs VLJ, Calil VMLT, Johnston C. Expert recommendations for the care of newborns of mothers with COVID-19. *Clinics.* 2020;75:e1932.
180. Becker J, Qiu D, Baron W, Wilting J. Immunofluorescence Studies on the Expression of the SARS-CoV-2 Receptors in Human Term Placenta. *Cells Tissues Organs.* 2023;212(2):138–46.
181. Schwartz DA, Thomas KM. Characterizing COVID-19 maternal-fetal transmission and placental infection using comprehensive molecular pathology. *EBioMedicine.* 2020 Oct;60:102983.
182. Rolfo A, Cosma S, Nuzzo AM, Moretti L, Tancredi A, Canosa S, et al. Assessment of Placental Antioxidant Defense Markers in Vaccinated and Unvaccinated COVID-19 Third-Trimester Pregnancies. *Life.* 2024 Nov 29;14(12):1571.
183. Rolfo A, Cosma S, Nuzzo AM, Salio C, Moretti L, Sassoè-Pognetto M, et al. Increased Placental Anti-Oxidant Response in Asymptomatic and Symptomatic COVID-19 Third-Trimester Pregnancies. *Biomedicines.* 2022 Mar 9;10(3):634.
184. Moreno-Fernandez J, Ochoa JJ, De Paco Matallana C, Caño A, Martín-Alvarez E, Sanchez-Romero J, et al. COVID-19 during Gestation: Maternal Implications of Evoked Oxidative Stress and Iron Metabolism Impairment. *Antioxidants (Basel).* 2022 Jan 18;11(2).
185. Medovic RH, Srejovic IM, Medovic M V., Milosavljevic IM, Nikolic MR, Stojanovic AZ, et al. Variations of Redox Balance in Different Stages of Childhood Immune Thrombocytopenic Purpura. *Thromb Haemost.* 2023 Dec 21;123(12):1129–39.
186. Schwartz DA, Morotti D. Placental Pathology of COVID-19 with and without Fetal and Neonatal Infection: Trophoblast Necrosis and Chronic Histiocytic Intervillositis as Risk Factors for Transplacental Transmission of SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020 Nov 15;12(11):1308.
187. Schaumann N, Suhren JT. An Update on COVID-19-Associated Placental Pathologies. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2024 Feb 8;228(01):42–8.
188. Gulersen M, Prasannan L, Tam Tam H, Metz CN, Rochelson B, Meirowitz N, et al. Histopathologic evaluation of placentas after diagnosis of maternal severe acute

- respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2020 Nov 1;2(4):100211.
189. Belay G. Article Review on Histopathologic Features of Placenta and Adverse Outcome in Pregnant Women with COVID-19 Positive. *Pathology and Laboratory Medicine*. 2023 May 25;
 190. Benski C, Di Filippo D, Taraschi G, Reich MR. Guidelines for Pregnancy Management During the COVID-19 Pandemic: A Public Health Conundrum. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Nov 9;17(21):8277.
 191. Gullo G, Scaglione M, Cucinella G, Chiantera V, Perino A, Greco ME, et al. Neonatal Outcomes and Long-Term Follow-Up of Children Born from Frozen Embryo, a Narrative Review of Latest Research Findings. *Medicina (B Aires)*. 2022 Sep 4;58(9):1218.
 192. Roescher AM, Timmer A, Erwich JJHM, Bos AF. Placental Pathology, Perinatal Death, Neonatal Outcome, and Neurological Development: A Systematic Review. *PLoS One*. 2014 Feb 25;9(2):e89419.
 193. Fajardo-Martinez V, Ferreira F, Fuller T, Cambou MC, Kerin T, Paiola S, et al. Neurodevelopmental delay in children exposed to maternal SARS-CoV-2 in-utero. *Sci Rep*. 2024 May 24;14(1):11851.
 194. Gullo G, Scaglione M, Buzzaccarini G, Laganà AS, Basile G, Chiantera V, et al. Cell-Free Fetal DNA and Non-Invasive Prenatal Diagnosis of Chromosomopathies and Pediatric Monogenic Diseases: A Critical Appraisal and Medicolegal Remarks. *J Pers Med*. 2022 Dec 20;13(1).
 195. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Stručno-metodološko uputstvo za sprovođenje vanredne preporučene imunizacije protiv COVID-19 u Republici Srbiji vakcinama: Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine (Comirnaty), Gam-COVID-Vak, SARS-CoV-2 Vaccine (Vero Cell), Inactivated, ChAdOx1 nCoV-19 Corona Virus Vaccine (Recombinant) COV-ISHIELD/AstraZeneca, Spikevax. [Online]. Available online: <https://www.batut.org.rs/download/smuZaVanrednuPreporucenuImunizacijuProtivCOVID19.poslednji> (accessed on 16 September 2024).
 196. Maranto M, Gullo G, Bruno A, Minutolo G, Cucinella G, Maiorana A, et al. Factors Associated with Anti-SARS-CoV-2 Vaccine Acceptance among Pregnant Women: Data from Outpatient Women Experiencing High-Risk Pregnancy. *Vaccines (Basel)*. 2023 Feb 16;11(2).
 197. Incognito GG, Distefano REC, Campo G, Gulino FA, Gulisano C, Gullotta C, et al. Comparison of Maternal and Neonatal Outcomes between SARS-CoV-2 Variants: A Retrospective, Monocentric Study. *J Clin Med*. 2023 Oct 1;12(19):6329.
 198. Huntley BJF, Huntley ES, Di Mascio D, Chen T, Berghella V, Chauhan SP. Rates of Maternal and Perinatal Mortality and Vertical Transmission in Pregnancies Complicated by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Obstetrics & Gynecology*. 2020 Aug;136(2):303–12.

199. Duran P, Berman S, Niermeyer S, Jaenisch T, Forster T, Gomez Ponce de Leon R, et al. COVID-19 and newborn health: systematic review. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2020 Apr 27;44:1.
200. Taglauer E, Benarroch Y, Rop K, Barnett E, Sabharwal V, Yarrington C, et al. Consistent localization of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and ACE2 over TMPRSS2 predominance in placental villi of 15 COVID-19 positive maternal-fetal dyads. *Placenta*. 2020 Oct 1;100:69–74.
201. Fuentes-Zacarias P, Murrieta-Coxca JM, Gutiérrez-Samudio RN, Schmidt A, Schmidt A, Markert UR, et al. Pregnancy and pandemics: Interaction of viral surface proteins and placenta cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2021 Nov 1;1867(11):166218.
202. Facchetti F, Bugatti M, Drera E, Tripodo C, Sartori E, Cancila V, et al. SARS-CoV2 vertical transmission with adverse effects on the newborn revealed through integrated immunohistochemical, electron microscopy and molecular analyses of Placenta. *EBioMedicine*. 2020 Sep;59:102951.
203. Verma S, Joshi CS, Silverstein RB, He M, Carter EB, Mysorekar IU. SARS-CoV-2 colonization of maternal and fetal cells of the human placenta promotes alteration of local renin-angiotensin system. *Med*. 2021 May;2(5):575-590.e5.
204. Guo X, Semerci N, De Assis V, Kayisli UA, Schatz F, Steffensen TS, et al. Regulation of Proinflammatory Molecules and Tissue Factor by SARS-CoV-2 Spike Protein in Human Placental Cells: Implications for SARS-CoV-2 Pathogenesis in Pregnant Women. *Front Immunol*. 2022 Apr 7;13.
205. Taglauer E, Benarroch Y, Rop K, Barnett E, Sabharwal V, Yarrington C, et al. Consistent localization of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and ACE2 over TMPRSS2 predominance in placental villi of 15 COVID-19 positive maternal-fetal dyads. *Placenta*. 2020 Oct 1;100:69–74.
206. Hecht JL, Quade B, Deshpande V, Mino-Kenudson M, Ting DT, Desai N, et al. SARS-CoV-2 can infect the placenta and is not associated with specific placental histopathology: a series of 19 placentas from COVID-19-positive mothers. *Modern Pathology*. 2020 Nov;33(11):2092–103.
207. Edlow AG, Li JZ, Collier A ris Y, Atyeo C, James KE, Boatn AA, et al. Assessment of Maternal and Neonatal SARS-CoV-2 Viral Load, Transplacental Antibody Transfer, and Placental Pathology in Pregnancies During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Netw Open*. 2020 Dec 22;3(12):e2030455.
208. Definition and categorization of the timing of mother-to-child transmission of SARS-CoV-2 . In.
209. Garg R, Agarwal R, Yadav D, Singh S, Kumar H, Bhardwaj R. Histopathological Changes in Placenta of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-Cov-2) Infection and Maternal and Perinatal Outcome in COVID-19. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. 2023 Feb 22;73(1):44–50.

210. ⁵ Bos M, Nikkels PGJ, Cohen D, Schoones JW, Bloemenkamp KWM, Bruijn JA, et al. Towards standardized criteria for diagnosing chronic intervillitis of unknown etiology: A systematic review. *Placenta*. 2018 Jan 1;61:80–8.
211. Krop J, van der Meeren LE, van der Hoorn MLP, Ijsselstein ME, Dijkstra KL, Kapsenberg H, et al. Identification of a unique intervillous cellular signature in chronic histiocytic intervillitis. *Placenta*. 2023 Aug;139:34–42.
212. Sato Y, Maekawa K, Aman M, Yamashita A, Kodama Y, Maki Y, et al. CD39 downregulation in chronic intervillitis of unknown etiology. *Virchows Archiv*. 2019 Sep 19;475(3):357–64.
213. Capuani C, Meggetto F, Duga I, Danjoux M, March M, Parant O, et al. Specific infiltration pattern of FOXP3+ regulatory T cells in chronic histiocytic intervillitis of unknown etiology. *Placenta*. 2013 Feb 1;34(2):149–54.
214. Ferreira RC, Fragoso MBT, Tenório MC dos S, Martins AS da P, Borbely AU, Moura FA, et al. Biomarkers of placental redox imbalance in pregnancies with preeclampsia and consequent perinatal outcomes. *Arch Biochem Biophys*. 2020 Sep;691:108464.
215. ⁵ Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011 Jun 1;25(3):287–99.
216. ⁵ Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online*. 2003 Jan;6(1):84–96.
217. Kankofer M. Antioxidative Defence Mechanisms Against Reactive Oxygen Species in Bovine Retained and Not-Retained Placenta: Activity of Glutathione Peroxidase, Glutathione Transferase, Catalase and Superoxide Dismutase. *Placenta*. 2001 May 1;22(5):466–72.

СКРАЋЕНИЦЕ

COVID-19 - Coronavirus disease 2019

6

SARS-COV-2 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

FVM – (Fetal Vascular Malperfusion) Феталне васкуларне малперфузије

MVM – (Maternal Vascular Malperfusion) Матерналне васкуларне малперфузије

ROS – (Reactive Oxygen Species) Реактивне кисеоничне врсте

RNS – (Reactive Nitric Species) Реактивне азотне врсте

CRS – (Chlorine Reactive Species) Реактивне хлорне врсте

TAS – (Total Antioxidative Status) Тотални антиоксидативни статус

CAT – (Catalase) Каталаза

GPX- (Glutathione peroxidase) Глутатион пероксидаза

SOD – (Superoxide dismutase) Супероксид дизмутаза

IUGR- (Intrauterine Grow Restriction) Интраутерини застој у расту

6

TBARS- (Thiobarbituric acid Reactive Substances) Реактивне субстанце Тиобарбитуратне киселине

GSH – (Glutathione) Глутатион

RT-PCR – (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

ACE2 – (Angiotensin converting enzyme 2) -Ангиотензин конвертујући ензим 2

TMPRSS2-(Type 2 Transmembrane Serine Protease)

AOPP -(Advanced oxidation protein products) Производи унапредовале оксидације протеина

ARDS (Acute respiratory distress Syndrome) Акутни респираторни дистрес синдром

At- Антитело

CAT-M- каталаза мајке

CAT-P-каталаза плода

CD68- (Cluster of Differentiation 68) кластер диференцијација 68 моноцита

DNK- Деокси-рибонуклеинска киселина

FVM- (Fetal vascular malperfusion)- феталне васкуларне малперфузије

GST-(Glutathione transferase)- глутатион трансфераза

HRP-(Horseradish peroxidase)-

IgA- Имуноглобулин А

IgG- Имуноглобулин Г
 IgM- Имуноглобулин М
 IL- интерлеукин
 IL10-интерлеукин 10
 IL4- интерлеукин 4
 LPO-(Lipid peroxidation)- липидна пероксидација
 MDA- (Malondialdehyde) Малонил алдехид
 MERS- (Middle Eastern Respiratory Syndrome)
 MnSOD- Манган суупероксид дизмутаза
 MPO-(Myeloperoxidase)- Мијелопероксидаза
 mRNK-митохондријална рибонуклеинска киселина
 NADPH-(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) Никотин-аденин-динуклотид-фосфат
 NOS-(Nitrous oxide) -Азотни оксид
 ОС-оксидативни стрес
 qRT- (Quantitative Reverse Transcription)-Квантитативна реверзна транскриптаза
 RCOG-(Royal College of Obstetricians and Gynaecologists) -Краљевски колеџ за гинекологију и акушерство
 TAC-(Total antioxidant capacity)-Тотални антиоксидативни капацитет
 TMPRSS2-(Type 2 Transmembrane Serine Protease)- трансмембранска серин протеаза типа 2
 UKC-Универзитетски клинички центар
 VEGF-(Vascular endothelial growth factor) Васкуларни ендотелни фактор раста
 WHO-(World Health Organisation)- Светска здравствена организација
 ZnSOD-Цинк Супероксид дизмутаза
 RT-PCR-(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)-Ланчана реакција полимеразе реверзне транскрипције

Биографија

Др Марија Бићанин Илић рођена је 19.03.1981. у Прокупљу. Основну школу и Гимназију завршила је одличним успехом, као носилац дипломе „Вук С. Караџић“. Медицински факултет Универзитета у Нишу уписала је 2000. год, а дипломирала 2007. са просечном оценом 8.84. и одбранила дипломски рад „Хабитуални побачаји“ оценом 10.

Од 2009. год запослена је на Клиници за Гинекологију и акушерство Клиничког центра у Крагујевцу, најпре као клинички лекар, а од 2018. год након завршених специјалистичких студија одличном оценом, као лекар специјалиста гинекологије и акушерства. Запослена је на месту шефа одсека оперативног акушерства.

Докторске академске студије на смеру смера „Хумана репродукција и развој“, уписала је 2008., а усмени докторски испит положила је 2010. год оценом 10.

21.01.2020. год изабрана је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у звање асистента за ужу научну област Гинекологија и акушерство.

2024. уписала је уже специјалистичке студије на Медицинском факултету Универзитета у Београду из области гинеколошка онкологија.

Учесник је многобројних домаћих и страних научних скупова. Аутор је бројних публикација у иностраним и домаћим часописима као и коатор помоћног уџбеника за наставу студената медицине.

Члан је Лекарске коморе, Српског лекарског сруштва као и Удружења гинеколошке ендоскопије Србије. Познаје рад на рачунару, говори енглески и руски језик. Удата је, мајка је двојице синова.

Репрезентативне референце:

1. Bicanin Ilic, M.; Nikolic Turnic, T.; Ilic, I.; Nikolov, A.; Mujkovic, S.; Rakic, D.; Jovic, N.; Arsenijevic, N.; Mitrovic, S.; Spasojevic, M.; et al. SARS-CoV-2 Infection and Its Association with Maternal and Fetal Redox Status and Outcomes: A Prospective Clinical Study. *J. Clin. Med.* 2025, 14, 1555. <https://doi.org/10.3390/jcm14051555>
2. Bicanin-Ilic, M., Ilic, I., Dimitrijevic, A., Mujkovic, S., Jovic, N., Rakic, D., Arsenijevic, N., Nikolic-Turnic, T., Balovic, G., Peric, A., Mitrovic, A., & Nikolov, A. (2024). Case report: Spontaneous rupture of leiomyosarcoma uteri 8 months after primary laparoscopic surgery of STUMP. *Frontiers in medicine*, 11, 1407546. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.140754>
3. Ilic, M.B., Dimitrijevic, A. & Ilic, I. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome. *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR)*, 2017, Sciendo, vol. 0 no. 0, <https://doi.org/10.2478/sjecr-2019-0059>
4. Ilic, M.B. & Dimitrijevic, A. The Incidence of Adolescent Pregnancy at Clinic of Gynecology and Obstetrics of Clinical Center Kragujevac. *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR)*, 2019, Sciendo, vol. 23 no. 1, pp. 59-66. <https://doi.org/10.2478/sjecr-2019-0028>

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

”Постпартално испитивање утицаја COVID-19 на постелјично ткиво код пацијенткиња инфицираних током трудноће“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У __Крагујевцу__, _2025. године,



потпис аутора

Образац 2

***ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ***

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
„Постпартално испитивање утицаја COVID-19 на постељично ткиво код пацијенткиња
инфицираних током трудноће“
истоветне.

У Крагујевцу, 2025. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марија Бићанин Илић _____,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Постпартално испитивање утицаја COVID-19 на постелично ткиво код пацијенткиња инфицираних током трудноће“¹

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем преузимања.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

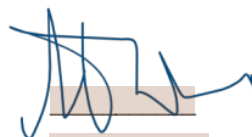
3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 2025. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

ПОСТПАРТАЛНО ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА COVID-19 НА ПОСТЕЉИЧНО ТКИВО ПАЦИЈЕНТКИЊА ИНФИЦИРАНИХ ТОКОМ ТРУДНОЋЕ

ORIGINALITY REPORT

7%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	Marija Bicanin Ilic, Tamara Nikolic Turnic, Igor Ilic, Aleksandar Nikolov et al. "SARS-CoV-2 Infection and Its Association with Maternal and Fetal Redox Status and Outcomes: A Prospective Clinical Study", Journal of Clinical Medicine, 2025 Crossref	423 words — 1%
2	rbej.biomedcentral.com Internet	265 words — 1%
3	www.bmj.com Internet	251 words — 1%
4	nardus.mpn.gov.rs Internet	247 words — 1%
5	pure.rug.nl Internet	240 words — 1%
6	nylatvian.org Internet	226 words — 1%
7	fedorakg.kg.ac.rs Internet	186 words — 1%
8	theses.bham.ac.uk Internet	

174 words — 1%

9 repositório.ufrn.br
Internet

158 words — 1%

EXCLUDE QUOTES OFF

EXCLUDE SOURCES < 1%

EXCLUDE BIBLIOGRAPHY OFF

EXCLUDE MATCHES < 9 WORDS