

Potencjalna rola peptydów antydrobnoustrojowych oraz witaminy D w leczeniu *Bacterial Vaginosis*

Therapeutic potential of antimicrobial peptides and vitamin D in bacterial vaginosis

© GinPolMedProject 4 (34) 2014

Artykuł poglądowy/Review article

TOMASZ JARZĘBSKI, MARTA BACZYŃSKA, JAROSŁAW KALINKA

Klinika Perinatologii I Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Kalinka

Adres do korespondencji/Address for correspondence:

Tomasz Jarzębski

Klinika Perinatologii I Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

ul. Wileńska 37, 94-029 Łódź

tel.: +48 692411330, e-mail: tomasz.jarzebski@gmail.com

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count 2448/2586

Tabele/Tables 0

Ryciny/Figures 0

Piśmiennictwo/References 86

Received: 15.02.2014

Accepted: 12.05.2014

Published: 29.12.2014

Streszczenie

Waginoza bakteryjna to beztlenowe zakażenie bakteryjne pochwy, występujące z manifestacją objawów lub bez. Głównym czynnikiem wpływającym na kolonizację bakteriami beztlenowymi jest anatomiczna bliskość jelitowego źródła bakterii oraz zanik fizjologicznych pałeczek kwasu mlekowego. Niski poziom witaminy D może powodować wzrost ryzyka wystąpienia *Bacterial Vaginosis* u kobiet ciężarnych. Niedobór witaminy D u kobiet ciężarnych oraz noworodków w Polsce jest bardzo częsty w związku z słabą ekspozycją na słońce w tej szerokości geograficznej (49-55 N) oraz zbyt niskim spożyciem tej witaminy przez kobiety ciężarne w diecie.

Przypuszcza się, iż kalcytriol wykazuje pośrednie działanie p/bakteryjne. Wykazano, że suplementacja witaminy D u pacjentów może efektywnie zwiększać produkcję m.in. katelicydyny. Defensyny i katelicydyny należą do peptydów antydrobnoustrojowych (PAD), nazywane są także naturalnymi antybiotykami.

W przypadku potwierdzenia zależności między niedoborem witaminy D, spadkiem poziomu białek mikrobowych a wzrostem występowania zakażeń dróg rodnych, a co za tym idzie wzrostem częstości porodów przedwczesnych istnieje możliwość suplementacji u kobiet z wyłonionej grupy ryzyka w tani i ogólnodostępny sposób, mając na uwadze, iż dotychczas stosowane metody leczenia BV w ciąży nie przyniosły wymiernego efektu.

Słowa kluczowe: witamina D; katelicydyna; defensyny; waginoza bakteryjna

Summary

Bacterial vaginosis is either a symptomatic or asymptomatic vaginal infection caused by anaerobic bacteria. The main factor behind vaginal colonisation with anaerobic bacteria is the close anatomical proximity of the vagina to the anus and the depletion of beneficial lactic acid bacteria. Low vitamin D levels may contribute to the increased risk of bacterial vaginosis in pregnant women. Vitamin D deficiency in pregnant women and infants is very common in Poland due to low sun exposure in this geographic region (49-55 N), and insufficient intake of vitamin D from food during pregnancy.

Calcitriol is believed to have an indirect effect on antibacterial activity. Vitamin D supplementation in patients was demonstrated to effectively increase calcitriol production. Defensins and cathelicidins are the two major families of antimicrobial peptides (AMPs), also known as the natural antibiotics.

If there is a like between vitamin D deficiency, reduced levels of antimicrobial peptides, and the increased incidence of gynaecological infections, which involves higher risk of pre-term birth, high-risk women may be perhaps given inexpensive and easily accessible food supplementation, especially given the fact that the currently available treatment options for BV during pregnancy are still limited.

Key words: Vitamin D; cathelicidins; defensins; bacterial vaginosis

WSTĘP

Witamina D jest prohormonem, który odgrywa istotną rolę w gospodarce wapniowo – fosforanowej oraz utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcji kośćca. Obecnie uważa się, że niedobór witaminy D dodatkowo jest m.in. czynnikiem ryzyka dla niektórych nowotworów, zwiększa ryzyko cukrzycy typu 2, chorób sercowo-naczyniowych oraz odgrywa rolę w regulacji procesów immunologicznych. Istnieją doniesienia wskazujące na niekorzystny wpływ nieprawidłowego stężenia 25 – hydroksykalciferolu w surowicy krwi kobiet ciężarnych zarówno na matkę, jak i na płód. Niski poziom witaminy D może powodować wzrost ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego, cukrzycy ciężarnych oraz *Bacterial Vaginosis*. Dzieci matek z niedoborem witaminy D mają zwiększone ryzyko transmisji wirusa HIV od zakażonej matki [1].

WITAMINA D

Stężenie 25 – hydroksykalciferolu w surowicy krwi jest związane z dziennym spożyciem witaminy D, ale przede wszystkim z ekspozycją na słońce. Wskazuje się na wpływ niskich stężeń witaminy D na nieprawidłową ekspresję genów odpowiedzialnych za proces wzrastania płodu. Płody matek z stwierdzonym niedoborem witaminy D mają niższą masę kostną ze względu na wpływ tej witaminy na proliferację i różnicowanie komórek w tkance kostnej. Receptor dla witaminy D (VDR) wpływa na ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za gospodarkę mineralną, wzrost i różnicowanie komórek oraz biotransformację leków. Ekspresja tego receptora została również stwierdzona w łożysku oraz w doczesnej.

Stężenie 25 – hydroksykalciferolu w żyle pępowinowej koreluje znacząco ze stężeniem witaminy D w surowicy krwi matki. Stwierdzono, że stężenie 25-hydroksykalciferolu w surowicy krwi noworodka koreluje ze stężeniem witaminy D stwierdzonym u kobiety ciężarnej, oznaczonym w III trymestrze. Niedobór witaminy D u kobiet ciężarnych oraz noworodków w Polsce jest bardzo częsty w związku z słabą ekspozycją na słońce w tej szerokości geograficznej (49-55 N) oraz zbyt niskim spożyciem tej witaminy przez kobiety ciężarne w diecie. Dla porównania częstość występowania niedoboru witaminy D w Stanach Zjednoczonych szacuje się na 78% wśród kobiet nieciężarnych, 83% w I trymestrze i 47% w III trymestrze ciąży [2,3].

INTRODUCTION

Vitamin D is an important prohormone which is known to regulate calcium and phosphorus metabolism and is essential for maintaining structural and functional status of the bone tissue. Vitamin D deficiency is believed to be a risk factor for some types of cancer, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases. Also, vitamin D is an immune system modulator. Abnormal 25-hydroxy-calciferol serum levels in pregnant women were associated with adverse effects on the mother and the baby. Low vitamin D levels may contribute to the increased risk of pre-eclampsia, gestational diabetes, and bacterial vaginosis. Babies of mothers with vitamin D deficiency are more exposed to mother-to-child transmission of HIV [1].

VITAMIN D

25-hydroxy-calciferol serum levels depend on the daily intake of Vitamin D from food, but mainly on sun exposure. Some reports suggest that vitamin D deficiency affects foetal growth by modifying expression of specific genes. Vitamin D regulates proliferation and differentiation of cells in the bone tissue, and therefore the offspring of mothers with vitamin D deficiency tend to have lower bone mass. Vitamin D Receptor (VDR) is the mediator of the expression of genes responsible for bone mineralisation, growth and differentiation of cells, and drug metabolism (biotransformation). VDR expression has been observed also in the placenta and in the decidua.

25-hydroxy-calciferol levels in cord blood correlate significantly with vitamin D levels in maternal serum. 25-hydroxy-calciferol levels in neonatal serum were shown to correlate with vitamin D concentration in maternal serum in the third trimester of pregnancy. Vitamin D deficiency in pregnant women and neonates in Poland is very common due to low sun exposure in this geographic region (49-55 N), and insufficient uptake of vitamin D from food during pregnancy. In comparison, the incidence of vitamin D deficiency in the USA is estimated at 78% in non-pregnant women, and at 83% and 47% in women in the first and third trimester of pregnancy, respectively [2,3]. There have been numerous reports advocating for the use of 1,000 IU/day of supplemental vitamin D [4-8], based on which the new recommendations for the Central Europe have been established: vitamin D supplementation from

Liczne doniesienia mówiące o konieczności stosowania wyższych dawek witaminy D >1000 IU [4-8] zawoocowały nowymi wytycznymi dla Europy Środkowej zalecającymi rozważenie rozpoczęcia suplementacji witaminą D od chwili potwierdzenia ciąży [11] lub wdrożenie suplementacji witaminą D najpóźniej od II trymestru ciąży w dawce 1500-2000 IU (prawie 4-krotny wzrost dawki w stosunku do poprzednich wytycznych z 2009r.) [4,9,10] Optymalnym postępowaniem w czasie ciąży i karmienia piersią byłoby indywidualne dobieranie dawki witaminy D tak, aby utrzymać poziom 25-OHD >30 ng/ml i aby prawidłowy zakres krążącej we krwi 25-OHD wahał się w granicach - 32 – 80 ng/ml [12,13].

Witamina D bierze udział w procesach immunologicznych i w odpowiedzi układu odpornościowego na inwazję bakteryjną, co może powodować jej pośredni wpływ na długość trwania ciąży. Hipoteza udziału witaminy D w modulacji odpowiedzi immunologicznej została postawiona blisko 25 lat temu, co związane było z odkryciem receptorów dla witaminy D – VDR (*vitamin D receptor*) na aktywowanych komórkach układu odpornościowego człowieka, zdolności kalcytriolu do hamowania proliferacji limfocytów T oraz zdolności do syntezy kalcytriolu przez pobudzone kontaktem z antygenem makrofagi, komórki dendrytyczne oraz keratynocyty.

Regulacji poprzez witaminę D podlega odporność typu humoralnego (adaptacyjnego). Zarówno limfocyty T, jak i B mają receptory dla tej witaminy. Interakcje witaminy D z odpornością typu humoralnego są złożone, a jej nowe aspekty są ciągle poznawane. Zidentyfikowano ponad 100 genów występujących w limfocytach T i B podlegających regulacji przez 1,25-(OH)₂-D₃. Odporność humoralna może być modulowana przez witaminę D praktycznie na wszystkich etapach powstawania odpowiedzi immunologicznej, począwszy od komórek prezentujących antygen, autoreaktywnych komórek T (supresja, nasilenie lub regulacja odpowiedzi odpornościowej), jak i w procesie prowadzącym do produkcji przeciwciał (komórki typu B). Upraszczając, można stwierdzić, że witamina D może być uznana za czynnik kontrolujący i promujący równowagę pomiędzy odpowiedzią immunologiczną generowaną przez komórki Th1 i Th2, czyli dwóch subpopulacji limfocytów T odpowiedzialnych za tzw. polaryzację immunologiczną. Witamina D hamuje proliferację komórek typu B, hamuje ich różnicowanie i sekrecję immunoglobulin. Poza tym, witamina D hamuje namnażanie limfocytów typu T i stymuluje przesunięcie populacji formy Th1 do fenotypu typu Th2 [14-16]. Ponadto witamina D wpływa na maturację komórek T, zmniejszając populację nastawionych prozapalnie komórek o fenotypie Th17. W wyniku tego zmniejsza się produkcja prozapalnych cytokin – IL-17 i IL-21, czemu towarzyszy zwiększenie wytwarzania cytokin działających przeciwzapalnie (np. IL-10). Witamina D działając na komórki monocytarne, zmniejsza ilość produkowanych przez nie

the beginning of pregnancy [11], or 1,500-2,000 IU/day of supplemental vitamin D introduced from the second trimester of pregnancy at the latest (the recommended dose has increased by almost 4 times as compared to the 2009 recommendations) [4,9,10]. It would be best to adapt the dose of supplemental vitamin D to individual needs during pregnancy and breastfeeding to maintain 25-OHD >30 ng/ml and the circulating 25-OHD levels of 32 to 80 ng/ml [12,13].

Vitamin D is an immune system modulator that has multiple critical functions in regulating the response to pathogen invasion, which means it may indirectly affect the duration of pregnancy. Vitamin D was first hypothesised to modulate the immune system response almost 25 years ago, with the discovery of Vitamin D Receptor (VDR) on the activated cells of the human immune system, the ability of calcitriol to inhibit lymphocyte T proliferation, and the ability of activated macrophages, dendritic cells and keratinocytes to synthesise calcitriol.

Vitamin D modulates the humoral (adaptive) immune response. Vitamin D receptors can be found on both T- and B-cells. Vitamin D interactions with the humoral (adaptive) immune system are complex and have not been fully explored yet. Over 100 genes have been identified to be present in T- and B-cells and regulated by 1,25-(OH)₂-D₃. Vitamin D may modulate virtually all stages of the humoral immune response, from the antigen-presenting cells, autoreactive T cells (suppression, intensification and regulation of the immune response), to the inhibition of antibody expression (B cells). In plain terms, vitamin D can be said to control and promote the balance between the immune response generated by Th1 and Th2 cells, two subpopulations of T-cells responsible for polarized immune response. Vitamin D inhibits proliferation of B cells and the differentiation and secretion of immunoglobulins. Vitamin D is also known to inhibit proliferation of T cells and to stimulate Th1 to Th2 shift [14-16]. Moreover, Vitamin D plays a role in the maturation of T cells by reducing the population of proinflammatory Th17 cells. It reduces the secretion of proinflammatory IL-17 and IL-21 family cytokines, which is accompanied by increased secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10, etc.). By acting on monocytes, vitamin D reduces the volumes of proinflammatory cytokines they produce, including IL-1, IL-6, IL-8, and IL-12 TNF- α cytokines [17,18].

prozapalnych cytokin, takich jak: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12TNF- α [17,18].

Podwyższony poziom cytokin prozapalnych stwierdzany w łożysku silnie koreluje z preeclampsją, poronieniami czy porodami przedwczesnymi. W łożyskach kobiet z niedoborem witaminy D opisywano zwiększony poziom cytokin prozapalnych w drogach rodnych tj. TNF α , IL-6 czy IFN γ [19].

Kalcytriol w odpowiednim stężeniu zapobiega produkcji cytokin prozapalnych indukowanych przez TNF- α w procesie regulowanym przez receptor witaminy D. Możemy przypuszczać, że TNF- α hamuje syntezę hormonów łożyska i stymuluje katabolizm kalcytriolu poprzez regulację enzymów biorących udział w tym procesie [19]. W hodowlach ludzkich trofoblastów podaż kalcytriolu zmniejszała ekspresję IL-10 nawet wtedy, gdy były one stymulowane przez TNF α , (TNF α w badaniach *in vitro* indukuje ekspresję interleukiny 10). W związku z tym wydaje się, że kalcytriol w łożysku tłumi zarówno cytokiny wydzielane przez limfocyty Th1 i Th2 niejako przejmując działanie przeciwzapalne IL-10. Zaprezentowane działanie kalcytriolu wskazuje, iż pomaga on w utrzymaniu tolerancji immunologicznej między matką a płodem [20]. Przypuszcza się, iż kalcytriol wykazuje pośrednie działanie przeciwbakteryjne np., hamuje namnażanie prątków *Mycobacterium tuberculosis*. W badaniach doświadczalnych potwierdzono, że śmierć prątków gruźlicy występowała tylko w surowicy z dodatkiem 25-OH-D w odpowiednim stężeniu [21]. Opublikowane wyniki randomizowanego, badania oceniającego wpływ suplementacji witaminy D na postać płucną gruźlicy, pokazują, że podawanie 10 000 IU witaminy D dziennie przez 6 tygodni było związane z wyższym, potwierdzonym bakteriologicznie odsetkiem eliminacji prątków gruźlicy z płwociny oraz poprawą radiologiczną, w stosunku do chorych przyjmujących placebo. W kolejnych badaniach analizowano, w jaki sposób monocyty i makrofagi eliminują prątki gruźlicy. Receptory szlaku *toll* uznawane są za tzw. pierwszą linię obrony organizmu przed drobnoustrojami. Aktywacja receptora *toll-like* (*toll-like receptors* – TLRs; receptory obecne na powierzchni wielu typów komórek, które rozpoznają typowe elementy komórek bakteryjnych i inicjują wewnątrzkomórkową kaskadę reakcji prowadzącą do unieszkodliwienia danego patogenu) na powierzchni monocytu powoduje ekspresję w komórkach monocytarnych genu dla enzymu CYP27B1, który konwertuje krążącą we krwi 25-OH-D do jej aktywnej formy 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ oraz zwiększoną ekspresję VDR w jądrze komórkowym. Receptor witaminy D (VDR) po połączeniu ze swoim ligandem, którym jest aktywna forma witaminy D, czyli 1,25(OH) $_2$ D $_3$, pełni funkcję przełącznika genowego, kompleks taki (VDR + 1,25(OH) $_2$ D $_3$) łączy się z sekwencją nukleotydów, która znajduje się w genomie peptydów antydrobnoustrojowych, nazywanym VDRE (vitamin D reaction element). W efekcie tego dochodzi do transkrypcji genu w mRNA i produkcji bakte-

Elevated proinflammatory cytokine levels in the placenta strongly correlate with pre-eclampsia, miscarriages, or pre-term births. In women with vitamin D deficiency, elevated levels of proinflammatory cytokines were reported in the birth canal, including TNF α , IL-6, or IFN γ [19].

Calcitriol at physiological concentrations prevents the production of proinflammatory cytokines induced by TNF- α in a process regulated by VDR. TNF- α can be assumed to inhibit the synthesis of placental hormones and to stimulate calcitriol catabolism by regulating enzymes that are involved in this process [19]. In cultured trophoblasts of the human placenta, calcitriol supply reduced IL-10 expression despite stimulation by TNF- α , (in *in vitro* studies, TNF- α was shown to induce IL-10 expression). Calcitriol in the placenta most probably inhibits cytokines synthesis by Th1 and Th2 cells, virtually taking over the anti-inflammatory role of IL-10. In this respect, calcitriol helps maintain the immune tolerance of mother against foetus [20]. Calcitriol is also suspected to exhibit indirect antibacterial action. For example, it may inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*. In experimental studies, TB bacilli were shown to extinguish only if the serum contained appropriate concentration of 25-OH-D [21]. In a randomized study evaluating the effects of vitamin D supplementation on pulmonary tuberculosis, 10,000 IU/day of supplemental vitamin D for 6 weeks was associated with higher TB elimination rates in the sputum, as confirmed in bacteriological tests, as well as improvement in radiological tests, as compared to placebo. Later studies analysed how monocytes and macrophages eliminate TB. Toll-like receptors are considered to provide the first line of defence against microbial aggressions. TLRs activation (toll-like receptors are present on many types of cells, they recognise typical elements of bacterial cells and initiate intracellular signalling cascades to inactivate the pathogen) on the monocyte surface induces Cyp27B1 gene expression in monocytes, which converts circulating 25-OH-D into active 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ and boosts VDR expression in the nucleus of the cell. Vitamin D Receptor (VDR) binds to the ligand (1,25(OH) $_2$ D $_3$) and acts as a “gene switch”. VDR + 1,25(OH) $_2$ D $_3$ complex binds to the nucleotide sequences of VDRE (vitamin D reaction element) in the antimicrobial peptides genome. The gene is transcribed in mRNA and the bactericidal peptides (cathelicidins) are produced [22,23]. Optimal cathelicidin synthesis offering effective antibacterial protection can be only obtained if 25-OH-D $_3$ is present in the circulating blood at min. 30-40 ng/ml (100 nmol/l) concentrations. Vitamin D supplementation in patients was shown to effectively boost cathelicidin synthesis induced by TLRs activation. In other words, it may directly increase the effectiveness of the defence mechanisms of the human body.

riobójczych peptydów (katelicydyny) [22,23]. Optymalna synteza katelicydyny zapewniająca wysoki poziom ochrony przeciwbakteryjnej możliwa jest w sytuacji, gdy stężenie krążącej 25-OH-D3 we krwi wynosi przynajmniej 30 - 40 ng/ml (100 nm/l). Wykazano, że suplementacja witaminy D u pacjentów może efektywnie zwiększać produkcję katelicydyny indukowaną przez pobudzenie TLRs, czyli wywierać bezpośredni wpływ zwiększający efektywność mechanizmów obronnych człowieka. Istnieją doniesienia, że podaż fenylomaślanu sodu (wskazany jako leczenie wspomagające w przewlekłej terapii zaburzeń cyklu mocznikowego, w tym niedoboru syntetazy karbamoilofosforanowej, karbamoilotransferazy ornitynowej lub syntetazy argininobur sztyńnianowej) czy kwasu foliowego również wzmacnia wytwarzanie katelicydyny, a wspólna podaż z witaminą D daje działanie addycyjne [24,25].

BIAŁKA PRZECIWMIKROBOWE

Defensyny i katelicydyny należące do peptydów anty-drobnoustrojowych (PAD), nazywane są także naturalnymi antybiotykami. U człowieka defensyny występują w wielu komórkach i tkankach, znajdują się w neutrofilach i płytkach krwi, w nabłonku układu oddechowego i moczowo-płciowego, w przewodzie pokarmowym, a także w wątrobie, skórze oraz w spojówce oka [26-32]. Wyróżniamy defensyny typu alfa (HNP 1-6) oraz typu beta (HBD 1-4).

Katelicydyny są peptydami kationowymi. Wykazują wysoki poziom ekspresji w peroksydazo ujemnych ziarnistościach neutrofilów oraz w komórkach naskórka i mogą spełniać funkcje naturalnego antybiotyku z uwagi na „bójcze” właściwości wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów [33,34]. U człowieka wykazano dotychczas tylko jedną katelicydynę – hCAP-18. Pod wpływem proteazy serynowej 3 z katelicydyny hCAP-18 uwalniany jest aktywny peptyd LL-37 o właściwościach bakteriobójczych [35,36], syntetyzowany przez szpik kostny, keratynocyty zakażonej skóry oraz nabłonek dróg oddechowych [37]. Katelicydyna hCAP-18 jest głównym białkiem w specjalnych ziarnistościach neutrofilów, ale występuje także w limfocytach i monocytach, w komórkach złuszczonego nabłonka, najądrzach i plazmie nasiennej, w płucach i w keratynocytach w przebiegu stanów zapalnych skóry. Biologiczne funkcje zlokalizowane są w C-końcu, aktywowanym przez rozszczepianie do holoprotein. C-końiec hCAP-18, LL-37, wykazuje szerokie działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, oddziałuje synergistycznie przeciwbakteryjnie z defensynami oraz jest czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilów, monocytów i komórek T, a ponadto może wiązać LPS [38]. Niektóre z białek p/mikrobowych powodują obniżenie uwalniania TNF- α [39]. Katelicydyny odgrywają rolę, jako mediatory zapalne wywierające wpływ na takie procesy, jak proliferacja komórek i ich migracja, procesy immunomodulacji, gojenia się ran, angiogenezy, uwalniania cytokin i hi-

According to some reports, sodium phenylbutyrate (as a supportive treatment in long-term therapy of urea cycle disorders, including deficiency of carbamoyl phosphate synthetase, ornithine carbamoyltransferase, or argininosuccinate synthetase) or folic acid supply also helps increase cathelicidin synthesis, and an additive effect was demonstrated when combined with vitamin D supplementation.

ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Defensins and cathelicidins are the two major families of antimicrobial peptides (AMPs), also known as the natural antibiotics. Defensins are present in many cells of the human body: in neutrophils, platelets, in epithelial cells of the respiratory and urogenital systems, in the gastrointestinal system, in the liver, skin, and conjunctiva [26-32]. There are alpha (HNP 1-6) and beta (HBD 1-4) defensins.

Cathelicidin is a cationic protein. It is highly expressed in peroxidase-negative granules of neutrophils and in endothelial cells. It can act as a “natural antibiotic” due to its bactericidal properties against a wide spectrum of pathogens [33,34]. Only one human cathelicidin, hCAP-18, is currently known. Serine protease 3 induces hCAP-18 to release LL-37 peptide of bactericidal properties [35,36], synthesized by the bone marrow, infected skin keratinocytes, and respiratory epithelium [37]. hCAP-18 is the main neutrophil-specific granule protein, but it is also present in subpopulations of lymphocytes and monocytes, in squamous epithelial cells, in epididymis and seminal plasma, in the lung, and in keratinocytes during inflammatory skin diseases. The biological functions reside in the C-terminus, which must be cleaved from the holoprotein to become active. The antibacterial C-terminus of hCAP-18, LL-37, shows broad antimicrobial activity toward both gram-negative and gram-positive bacteria, it has synergistic antibacterial effects with the defensins, and is a chemotactic agent for neutrophils, monocytes, and T cells, and can bind LPS [38]. However, some antimicrobial peptides may limit TNF- α release [39]. Cathelicidins are inflammatory mediators that play a role in cell proliferation and migration, immunomodulation, wound healing, angiogenesis, and in the release of cytokines and histamine [40]. LL-37 cytotoxic activity against normal mammalian cells was observed [41].

LL-37 present in the amniotic fluid and the skin of a newborn provides natural antimicrobial defence [42-46]. Cathelicidin was also shown to be present in the vernix in healthy full-term newborns. High concentrations of cathelicidin are not likely to be present where no infection exists, whereas cathelicidin synthesis and release can be induced by inflammatory conditions [47].

staminy [40]. Stwierdzono, że LL-37 wykazuje działanie cytotoksyczne w stosunku do normalnych komórek ssaków [41].

Obecność katalicydiny LL-37 w płynie owodniowym oraz w skórze nowo narodzonego dziecka działa ochronnie i stanowi wrodzoną barierę antydrobnoustrojową [42-46]. Udowodniono, że katalicydyna jest obecna w mazi płodowej u zdrowych donoszonych noworodków. Prawdopodobnie nie występuje ona w wysokich stężeniach przy braku infekcji, natomiast stan zapalny indukuje jej syntezę i uwalnianie [47]. Badanie przeprowadzone przez Havelkę i wsp. jednoznacznie wykazało, że po porodzie drogami i siłami natury stężenie LL 37 we krwi pępowinowej jest 3. krotnie wyższe niż po cięciu cesarskim. Zaobserwowano również wysoce istotną korelację między stężeniem katalicydiny w krwi matki i w krwi pępowinowej, niezależnie od drogi porodu. Najprawdopodobniej odzwierciedla to transport przezłożyskowy tego peptydu podczas późnej ciąży i porodu. Po porodzie przez cięcie cesarskie w surowicy matczynej stwierdzano wyższy poziom LL37 niż w surowicy krwi pępowinowej, z niskim gradientem stężeń LL37 między matką a noworodkiem. Zależności tej nie obserwowano po porodzie drogami i siłami natury. We krwi pępowinowej stwierdzono trzykrotny wzrost stężenia hCAP18 po porodzie siłami natury w porównaniu z cięciem cesarskim, co wskazuje na uwalnianie peptydu przez płód w odpowiedzi na stres [48].

Interesująca jest również obserwacja Bhana i wsp. dotycząca zdrowych osób mówiąca o pozytywnej korelacji pomiędzy całkowitym stężeniem katalicydiny (nieaktywnej postaci hCAP18 oraz LL-37) a poziomem 25(OH)D poniżej 32ng/ml ($p=0,005$) lecz nie wyższym. W dalszej części badania osoby z niedoborem witaminy D zostały poddane leczeniu ergokalcyferolem, a istotnie statystyczny wzrost katalicydiny został osiągnięty tylko w grupie o najwyższym przyroście poziomu witaminy D (pomiędzy 32-64ng/ml) u osób z najniższymi wyjściowymi wartościami witaminy D [49]. Do podobnych wniosków doszedł Dixon i wsp. [50]. Jeng i wsp. zaobserwowali pozytywną korelację między stężeniem 25(OH)D a LL-37 u pacjentów z sepsą oraz w krytycznym stanie przyjętych na oddział intensywnej opieki medycznej. Poziom LL-37 w grupie kontrolnej był istotnie statystycznie wyższy. Interesujące jest to, że 100% pacjentów z sepsą, 92% chorych w krytycznym stanie oraz 66,5% osób zdrowych miało stężenie 25(OH)D poniżej 30ng/ml [51].

Natomiast badania Adamsa i wsp. w grupie starszych osób z rozpoznaną chorobą kości nie wykazały wyżej prezentowanych zależności, prawdopodobnie starszy wiek grupy badanej oraz osteoporoza mogły mieć wpływ na wyniki badań [52].

Badanie przeprowadzone przez Nguyena i wsp. wykazało, że obniżony poziom stężenia w osoczu aktywnego metabolitu 1,25(OH)2D może być silnym predyktorem 30. dniowej umieralności u pacjentów z sepsą

In a study by Havelka et al., the levels of LL 37 in cord blood were demonstrated to be three-times higher after natural vaginal childbirth than in children born by Caesarean section. A highly significant correlation was also observed between the concentration of cathelicidin in maternal and cord blood, independently of the type of delivery. These findings most probably reflect the transplacental transmission of this peptide during late pregnancy and during labour. After Caesarean section, higher LL37 levels were detected in maternal serum than in cord blood serum, with low mother-to-newborn concentration gradient of LL37. This correlation was not observed after natural vaginal childbirth. hCAP18 concentration in cord blood was three-times higher after natural vaginal childbirth as compared to Caesarean section, which may indicate this peptide is released by the foetus in response to stress [48].

Bhana et al. observed a positive correlation between total cathelicidin concentrations (inactive hCAP18 and LL-37) and 25(OH)D levels below or equal to 32ng/ml ($p=0.005$) in healthy individuals. Later in the study, subjects with vitamin D deficiency received ergocalciferol, and a statistically significant increase in cathelicidin was demonstrated only in subjects with the highest increase of vitamin D levels (32-64 ng/ml) who had the lowest baseline vitamin D concentrations [49]. Similar conclusions were drawn by Dixon et al. [50]. Jeng et al. observed a positive correlation between 25(OH)D and LL-37 concentrations in patients with sepsis and those admitted to ICU in a critical condition. LL-37 levels in the control group were statistically significantly higher. What is even more interesting, 25(OH)D levels of less than 30ng/ml were found in all patients with sepsis (100%), in 92% of critically-ill patients, and in 66.5% of healthy controls [51].

However, no similar correlations were found in studies by Adams et al. on elderly patients with a known bone disease. The study results could be influenced by advanced age and osteoporosis present in the study subjects [52].

In a study by Nguyena et al., the lower plasma level of active 1.25(OH)2D was demonstrated to have a strong predictive value of 30-day mortality in patients with severe sepsis [53]. A link between low levels of 25(OH)D (1.25(OH)2D substrate) and cathelicidin and the risk of sepsis, prolonged hospitalisation, or increased mortality was demonstrated in a number of previous studies [53-58].

[53]. Wiele poprzednich badań ukazywało związek między niskim stężeniem 25(OH)D (substratu dla 1,25(OH)2D) oraz niskim stężeniem katalicydyny a ryzykiem sepsy, dłuższym pobytem w szpitalu czy zwiększoną umieralnością [53-58].

BAKTERYJNA WAGINOZA (BV)

Waginoza bakteryjna to beztlenowe zakażenie bakteryjne pochwy, występujące z manifestacją objawów lub bez. Głównym czynnikiem wpływającym na kolonizację bakteriami beztlenowymi jest anatomiczna bliskość jelitowego źródła bakterii oraz zanik fizjologicznych pałeczek kwasu mlekowego (*Lactobacillus*). Jako przyczyny m.in. uważa się okresowe spadki odporności występujące u ciężarnych [59-63]. W okresie dojrzałości płciowej dominują liczebnie bakterie kwasu mlekowego (*lactic acid bacteria* – LAB) przede wszystkim z rodzaju *Lactobacillus*. Bakterie te dzięki różnym mechanizmom antagonistycznym (produkcja kwasów organicznych, H₂O₂, bakteriocyn) ograniczają namnażanie się innych mikroorganizmów bytujących w drogach rodnych kobiet, zmniejszając w ten sposób prawdopodobieństwo zakażenia patogenami przenoszonymi drogą płciową [64-67]. Częstość występowania bakteryjnego zakażenia pochwy jest różna w poszczególnych okresach życia kobiety, począwszy od okresu pokwitania do okresu pomenopauzalnego. BV rozpoznawana jest zarówno u kobiet, które nie rozpoczęły życia płciowego, jak i aktywnych płciowo [68-70]. BV nie jest uznawane za chorobę przenoszoną drogą płciową, gdyż po pierwsze stwierdzana jest u 12%-18% kobiet, które nie rozpoczęły życia płciowego, po drugie leczenie partnerów seksualnych kobiet z rozpoznanym BV nie zapobiega nawrotom choroby [68-72]. Niski poziom witaminy D może powodować wzrost ryzyka wystąpienia *Bacterial Vaginosis* u kobiet ciężarnych (nie potwierdzono takiej zależności u kobiet nie będących w ciąży [73]). U kobiet z BV będących w ciąży stężenie cytokin pozapalnych w drogach rodnych jest większe niż u kobiet bez BV [74]. U kobiet ciężarnych częstość występowania BV waha się od 1,6% u kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą do 14,2% u kobiet z zagrażającym porodem przedwczesnym [75,76]. BV w ciąży zwiększa 2. krotnie ryzyko PPI [77-79]. Przełamanie mechanizmów miejscowej odporności nieswoistej i swoistej, związanych z błonami śluzowymi, ułatwia wnikanie drobnoustrojów z pochwy do górnego odcinka dróg rodnych. Wówczas bakterie mogą powodować u kobiet ciężarnych zakażenia doczesnej, kosmówki i płynu owodniowego. Zakażenia wewnątrz owodniowe często prowadzą do powikłań w postaci: przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego, zagrażającego porodu przedwczesnego, niskiej masy urodzeniowej noworodków, poporodowego zapalenia błony śluzowej macicy. Porody przedwczesne, są główną przyczyną zachorowań i umieralności okołoporodowej noworodków [80]. Obecna terapia antybiotykowa BV nie przynosi zamierzonych efektów w zmniejszaniu liczby porodów

BACTERIAL VAGINOSIS

Bacterial vaginosis is either a symptomatic or asymptomatic vaginal infection caused by anaerobic bacteria. The main factor behind vaginal colonisation with anaerobic bacteria is the close anatomical proximity of the vagina to the anus and the depletion of beneficial lactic acid bacteria (*Lactobacillus*). Periods of lowered immunity during pregnancy are believed to be one of the causative factors of BV [59-63]. In the period of sexual maturity, lactic acid bacteria (LAB) prevail in the vaginal microflora, mainly *Lactobacillus* bacteria. LAB have a well-documented antagonistic activity (production of organic acids, H₂O₂, bacteriocins) and thus limit proliferation of other microbes in the female reproductive tract and the risk of infection by sexually-transmitted pathogens [64-67]. BV incidence varies in different periods of life, starting from the puberty to post-menopausal period. BV is diagnosed both in virginal and sexually active women [68-70]. BV is not considered a sexually-transmitted disease: it is diagnosed in 12%-18% of virginal women, and the treatment of sexual partners of women diagnosed with BV does not prevent disease recurrence [68-72]. Low vitamin D levels may contribute to the higher risk of bacterial vaginosis in pregnant women (no similar correlation was demonstrated in non-pregnant women [73]). The concentration of proinflammatory cytokines in pregnant women with BV was found to be higher than in women without BV [74]. BV incidence in pregnant women varies from 1.6% in healthy women with physiological pregnancy to 14.2% in women in complicated pregnancy at risk of pre-term labour [75,76]. BV during pregnancy induces at least a two times greater risk of PPI [77-79]. Deficiencies in local mucosal specific and nonspecific immune responses make it easier for pathogens to cause infection that ascends from the vagina into the upper genital tract. Bacteria may cause deciduitis, chorionitis, and an intra-amniotic infection. Intra-amniotic infections might lead to complications, including premature rupture of membranes, risk of pre-term birth, low birth weight, or postpartum endometritis. Pre-term births are the main cause of peri-neonatal mortality and morbidity [80]. The current BV antibiotic therapy does not produce the intended outcomes, i.e. it does not reduce the incidence of pre-term births [80]. Mitchell et al. found a link between lower levels of hBD-3 in vaginal secretion of pregnant women with bacterial vaginosis. It is now known if lower hBD-3 levels indicate higher susceptibility to BV, or if it may be attributed to one of many defence mechanisms of the bacteria (inhibition by suppressing the toll-like receptor). These correlations have not been demonstrated for HBD2 or α -defensins 1-3 [81,82]. Heine et al. did not identify any link between pre-term birth (before 37th week of gestation) in women without intrauterine infection, and the elevated levels of defensins [83]. Similar conclusions were drawn in another study, where no relationship was

przedwczesnych [80]. Mitchell i wsp. stwierdzili zależność między obniżonym stężeniem peptydu HBD 3 w wydzielinie pochwy kobiet ciężarnych z BV. Nie wiadomo czy obniżony poziom tego peptydu może świadczyć o podatności na wystąpienie BV, czy może to być spowodowane jednym z wielu mechanizmów obronnych, którymi dysponują bakterie np. hamując ich produkcję przez supresję receptora *toll-like*. Nie wykazano wyżej prezentowanych zależności dla HBD2 czy Alfa defensyn 1-3 [81,82]. Heine i wsp. nie znaleźli związku między porodem przedwczesnym przed 37. tygodniem u kobiet bez wewnątrzmacicznej infekcji oraz pPROM a podwyższonym poziomem defensyn [83]. Do podobnych wniosków doszli autorzy innej pracy, również nie wykazując zależności między wzrostem defensyn w wydzielinie szyjkowej a porodem przedwczesnym, zwracając zarazem uwagę na fakt braku pomiaru stężeń defensyn w momencie wystąpienia PPI, a jedynie wykonania, kontrolnego pomiaru defensyn między 24. a 29. tygodniem ciąży [84,85].

Bodnar i wsp. udowodnili, że prawdopodobieństwo wystąpienia BV spada, gdy poziom witaminy D 25(OH)D osiąga wartość równą lub większą 80 nmol/l. Wykazali ścisły związek między BV a niedoborem witaminy D u czarnoskórych kobiet we wczesnej ciąży (16 tydz. c.) ale nie w przypadku kobiet rasy białej. Różnica ta może być spowodowana większym odsetkiem kobiet ciemnoskórych z niższymi wartościami witaminy D (75% <37,5nmol/l) biorącymi udział w badaniu w stosunku do kobiet rasy białej, które charakteryzowały się w prawie 60% wartościami suboptymalnymi lub optymalnymi, w granicy 50-80 lub > 80nmol/l [86].

PODSUMOWANIE

Infekcja jest jednym z najbardziej prawdopodobnych czynników ryzyka porodu przedwczesnego. Natomiast porody przedwczesne są jedną z przyczyn zwiększonej umieralności okołoporodowej noworodków oraz odległych powikłań dotyczących rozwoju psychicznego i fizycznego wcześniaków. W przypadku potwierdzenia zależności między niedoborem witaminy D, spadkiem stężenia białek mikrobowych a wzrostem występowania zakażeń dróg rodnych, a tym samym wzrostem częstości porodów przedwczesnych, istnieje możliwość suplementacji u kobiet z wyłonionej grupy ryzyka w tani i ogólnodostępny sposób, mając na uwadze, iż dotychczas stosowane metody leczenia BV w ciąży nie przyniosły wymiernego efektu.

demonstrated between increase in the levels of defensins in cervical discharge and pre-term births. It was also noted that the levels of defensins were not tested during PPI, and were only monitored between 24th and 29th week of gestation [84,85].

Bodnar et al. proved the incidence of BV to be reduced when the levels of 25-hydroxy vitamin D are equal to or above 80nmol/l. A close link was observed between BV and vitamin D deficiency in black women in early pregnancy (16 weeks of gestation), but not in white middle-class women. The difference may be attributed to the higher percentage of black women with lower vitamin D levels (75% <37.5nmol/l) than in white women included in the study, nearly 60% of whom had suboptimal or optimal vitamin D levels at 50-80 or > 80nmol/l, respectively [86].

SUMMARY

Infection is one of the most common risk factors of pre-term birth. Pre-term labour and birth are one of the causes of increased perinatal mortality and distant complications in physical and mental development of pre-term babies. If there is a link between vitamin D deficiency, reduced levels of antimicrobial peptides, and the increased incidence of gynaecological infections, which involves higher risk of pre-term birth, high-risk women may be perhaps given inexpensive and easily accessible food supplementation, especially given the fact that the currently available treatment options for BV during pregnancy are still limited.

Piśmiennictwo / References:

1. **Baret H, Mc Elduff A.** Vitamin D and pregnancy: AN old Problem Revisted. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004;24:527-39.
2. **Ginde AA, Liu MC, Camargo CA Jr.** Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med* 2009; 169:626-32.
3. **Ginde AA, Sullivan AF, Mansbach JM, Camargo CA Jr.** Vitamin D insufficiency in pregnant and nonpregnant women of childbearing age in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:436.e1-8.
4. **Pludowski P, Karczarewicz E, Czech-Kowalska J i wsp.** Nowe spojrzenie na suplementację witaminą D. *Standardy Med* 2009; 1(6):23-41.
5. **Wagner CL, Greer FR.** Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children and adolescents. *Pediatrics* 2008;122:1142-1152.
6. **Godel JC** and First Nations, Inuit and Health Committee, Canadian Pediatric Society. Vitamin D supplementation: Recommendations for Canadian mothers and infants. *Pediatrics & Child Health* 2007;12:583-589.
7. **Hollis BW, Wagner CL.** Vitamin D requirements during lactation: high-dose maternal supplementation as a therapy to prevent hypovitaminosis D for both the mother and the nursing infant. *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (suppl): 17522-8.
8. **Taylor SN, Carol L, Wagner MD et al.** Vitamin D supplementation during lactation to support infant and mother. *J Am Col Nutr* 2008;27 (6):690-701.
9. **Wagner CL, Greer FR.** Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants. Children and adolescents. *Pediatrics* 2008, 122:1142-52.
10. Vitamin D supplementation: Recommendations for Canadian mothers and infants *Pediatric Child Health* 2007 Sep, 12: 583-98.
11. **Pludowski P et al.** Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe —recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency *Endokrynologia Polska* DOI: 10.5603/EP.2013.0012. 2013;4;64.
12. **Holick MF.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266–81.
13. **Mulligan ML, Felton SK, Riek AE, Bernal-Mizrachi C.** Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:429.e1–9.
14. **Bikle DD.** Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:348-352.
15. **Van Etten E, Dacallonne B, Mathieu Ch.** 1,25-dihydroxycholecalciferol: endocrinology meets the immune system. *Proc Nutr Soc* 2002; 61:375–380.
16. **Deluca HF, Cantorna MT.** Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001;15:2579–2585.
17. **Hewison M.** An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(3): 315–325.
18. **Adams JS, Hewison M.** Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(2):80–90. [PubMed: 18212810].
19. **Diaz L, Noyola-Martinez N, Barrera D et al.** Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *J Reprod Immunol* 2009; 81:17–24.
20. **Barrera D, Noyola-Martinez N, Avila E et al.** Calcitriol inhibits interleukin-10 expression in cultured human trophoblasts under normal and inflammatory conditions *Cytokine*. 2012;57(3):316-21. doi:10.1016/j.cyt.2011.11.020. Epub 2011 Dec 17.
21. **Liu PT, Stenger S et al.** Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770.
22. **Liu PT, Stenger S, Li H et al.** Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311(5768):1770–1773. [PubMed: 16497887].
23. **Yamshchikov AV, Kurbatova EV, Kumari M et al.** Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis *Am J Clin* 2010;92:603-11.
24. **Akhirunnesa M et al.** Oral intake of phenylbutyrate with or without vitamin D3 upregulates the cathelicidin LL-37 in human macrophages: a dose finding study for treatment of tuberculosis. *BMC Pulmonary Medicine* 2013;13:23.
25. **Dunlop A, Robert N, Taylor RN et al.** Maternal Vitamin D, Folate and Polyunsaturated Fatty Acid Status and Bacterial Vaginosis during pregnancy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2011; ID 216217:7.
26. **Szyk A., Wu Z., Tucker K et al.** Crystal structure of human α -defensin HNP4, HD5, and HD6. *Protein Sci* 2006;15:2749–2760.
27. **Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME.** Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002; 70:6524–6533.
28. **Liu AY, Destoumieux D, Wong AV et al.** Human β -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 2002;118:275–281.
29. **Niedźwiedzka-Rystwej P, Deptuła W.** Defensyny – ważny wrodzony element układu odpornościowego u ssaków. *Post Hig Med Dośw* 2008;62:524–529.
30. **Lehmann J, Retz M, Harder J et al.** Expression of human β -defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect Dis* 2002;2:20.
31. **Chromek M, Slamova Z, Bergman P et al.** The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 2006;12: 636–641.
32. **Agerberth B, Grunewald J, Castanos-Velez E et al.** Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:283–290.
33. **Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL.** Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 2003; 170:2274–2278.
34. **Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C et al.** An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003;111:1665–1672.
35. **Sorensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Monch K et al.** Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 2003; 170:5583–5589.
36. **Larrick J, Hirata M, Balint R et al.** Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1995;63:1291–1297.

37. **Schauber J, Svanholm C, Termén S et al.** Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signaling pathways. *Gut* 2003;52:735–741.
38. **Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F et al.** Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:972–982.
39. **Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD et al.** Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun* 1999;67:6084–6089.
40. **Bals R, Wilson JM.** Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:711–720.
41. **Sorensen OE, Follin P, Johansen AH et al.** Human cathelicidin, hCAO-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001;97:3951–3959.
42. **Boman HG.** Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 2003;254:197–215.
43. **Marchini G, Lindow S, Brismar H et al.** The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br J Dermatol* 2002;147:1127–1134.
44. **Oppenheim JJ, Biragyn A., Kwak LW, Yang D.** Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 2003;62: ii17–ii21.
45. **Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB. Jr.** Expression and activity of b-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol* 2005;174:1608–1615.
46. **Raba G, Kotarski J.** Evaluation of selected morphological markers of inflammation in afterbirth from idiopathic premature labors. *Ginekolog Pol* 2010;81(6):435–40.
47. **Kuźniak M, Szymankiewicz M.** Ludzka katelicyna LL-37 – białko przeciwmikrobowe i jego rola w układzie odporności wrodzonej u noworodków. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia* 2012; 5; 4:206–211.
48. **Mandic Havelka A, Yektaei-Karin E, Hultenby K et al.** Maternal plasma level of antimicrobial peptide LL37 is a major determinant factor of neonatal plasma LL37 level. *Acta Paediatr* 2010;99(6):836–41.
49. **Bhan I, Camargo CA Jr., Wenger J et al.** Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(5): 1302–1304.
50. **Dixon BM, Barker T, McKinnon T et al.** Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults *BMC Research Notes* 2012,5:575.
51. **Jeng L, Yamshchikov AV, Suzanne EJ et al.** Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis *J Transl Med* 2009;7:28.
52. **Adams JS, Ren S, Liu PT et al.** Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol* 2009; 182:4289–4295. [PubMed: 19299728].
53. **Nguyen HB, Eshete B, K. H. William Lau KH et al.** Serum 1,25-Dihydroxyvitamin D: An Outcome Prognosticator in Human Sepsis *PLoS ONE* 8(5): e64348. doi:10.1371/journal.pone.0064348 2013.
54. **Venkatram S, Chilimuri S, Adrish M et al.** (2011) Vitamin D deficiency is associated with mortality in the medical intensive care unit. *Crit Care* 2011;15:R292.
55. **Ginde AA, Camargo CA Jr, Shapiro NI.** Vitamin D insufficiency and sepsis severity in emergency department patients with suspected infection. *Acad Emerg Med* 2011;18:551–554.
56. **Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE et al.** Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med* 2009;7: 28.
57. **Flynn L, Zimmerman LH, Mc Norton K et al.** Effects of vitamin D deficiency in critically ill surgical patients. *Am J Surg* 2012;203:379–382. discussion 382.
58. **Arnson Y, Gringauz I, Itzhaky D, Amital H.** Vitamin D deficiency is associated with poor outcomes and increased mortality in severely ill patients. *QJM* 2012; 105:633–639.
59. **Amsel R, Totten PA, Spiegel CA et al.** Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74(1):14–22.
60. **Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL.** Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;29(2):297–301.
61. **Hay PE, Lamont RF, Taylor-Robinson D et al.** Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ* 1994;308(6924): 295–298.
62. **Hay PE, Ugwumadu A, Chowns J.** Sex, thrush and bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS* 1997; 8(10): 603–608.
63. **Romanik M, Martirosian G.** Frequency, diagnostic criteria and consequences of bacterial vaginosis in pregnant women. *Przegl Epidemiol* 2004;58(3):547–553.
64. **Wilks M, Wiggins R, Whiley A et al.** Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 713–717.
65. **Felten A, Barreau C, Bizet C, Lagrange PH, Philippon A.** Lactobacillus species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol* 1999; 37:729–733.
66. **Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL et al.** Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1989;27(2):251–256.
67. **Martin HL, Richardson BA, Nyange PM.** Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999;180:1863–1868.
68. **Bump RC, Buesching WJ.** Bacterial vaginosis in vaginal and sexually active adolescent females: evidence against exclusive sexual transmission. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:935–9.
69. **Cauci S, Driussi S, De Santo D et al.** Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2147–52.
70. **Yen S, Shafer MA, Moncada J et al.** Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military. *Obstet Gynecol* 2003;102:927–33.

71. **Vuykste BL, Ettiegne-Traore V, Anoma CK et al.** Assessment of the validity of and adherence to sexually transmitted infection algorithms at a female sex worker clinic in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Sex Transm Dis* 2003;30:284-91.
72. **Amsel R, Totten PA, Spiegel CA et al.** Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.
73. **Hensel KJ; Randis TM, Gelber SE.** Pregnancy-specific association of vitamin D deficiency and bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:41 -9.
74. **Yudin MH, Landers DV, Meyn L, Hillier SL.** Clinical and cervical cytokine response to treatment with oral or vaginal metronidazole for bacterial vaginosis during pregnancy: a randomized trial. *Obstet Gynecol* 2003; 102:527-34.
75. **Gratacos E, Figueras F, Barranco M et al.** Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram stain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur J Epidemiol* 1999;15:913-6.
76. **Rogoszewski M, Grudzień J, Szuocik P.** Przydatność badań ekosystemu pochwy u kobiet, ze szczególnym uwzględnieniem zagrażającego porodu przedwczesnego. *Wiad Lek* 2003;56:333-6.
77. **Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA et al.** Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant: the Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1737-42.
78. **Holst E, Goffeng AR, Andersch B.** Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome. *J Clin Microbiol* 1994;32:176-86.
79. **Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G et al.** Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG* 2009;116:1315-24.
80. **Romanik M, Martirosian G.** Częstość występowania, kryteria diagnostyczne i następstwa bakteryjnego zakażenia pochwy u kobiet ciężarnych. *Przeg. Epidemiol* 2004;547-53.
81. **King AE, Kelly RW, Sallenave JM et al.** Innate immune defences in the human uterus during pregnancy. *Placenta* 2007;28:1099-106.
82. **Soto E, Espinoza J, Nien JK et al.** Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20:15-22.
83. **Heine RP, Wiesenfeld H, Mortimer L, Greig PC.** Amniotic fluid defensin: Potential markers of subclinical intrauterine infection. *Clin Infect Dis* 1998;27:513-8.
84. **Balu RB, Savitz DA, Ananth CV et al.** Bacterial Vaginosis, Vaginal Fluid Neutrophil Defensins, and Preterm Birth The American College of Obstetricians and Gynecologists 2003;101;5,PART1.
85. **Heine RP, Wiesenfeld H, Mortimer L, Greig PC.** Amniotic fluid defensin: Potential markers of subclinical intrauterine infection. *Clin Infect Dis* 1998;27:513-8.
86. **Bodnar LM, Krohn MA, Hyagriv N, Simhan HN.** Maternal Vitamin D Deficiency Is Associated with Bacterial Vaginosis in the First Trimester of Pregnancy. *The Journal of Nutrition Nutritional Epidemiology* [published online April 8, 2009; doi:10.3945/jn.108.103168].