

HET GEBRUIK VAN BERBERINE, EEN MOLECULE UIT DE TRADITIONELE CHINESE GENEESKUNDE, ALS VOER- OF DRINKWATERADDITIEF BIJ DIEREN

Aantal woorden: 18 655

Justine Clinquart

Studentennummer: 01704889

Promotor: Prof. dr. ir. Van Immerseel

Promotor: Prof. dr. Ducatelle

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2019 – 2020

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

PREAMBULE

De Covid19 pandemie had geen invloed op de uitwerking van deze masterproef.

VOORWOORD

Hierbij zou ik graag mijn promotor prof. dr. ir. Van Immerseel willen bedanken voor zijn begeleiding en zijn uitgebreide feedback. Ik zou eveneens mijn co-promotor prof. dr. Ducatelle willen bedanken voor al zijn verbeteringen en suggesties. Ik ben beide promotoren ook zeer dankbaar om mij dit uitdagende onderwerp aan te rijken. Dankzij dit onderwerp heb ik vnl. een beter beeld gekregen van farmacologische studies.

Ook mijn ouders en mijn oma, op wie ik altijd heb kunnen rekenen, verdienen een woord van dank. Tijdens het maken van deze masterproef heeft mijn broer Rémi vaak geholpen met technische problemen (o.a. mijn printer) waarvoor ik hem wil bedanken. Tot slot bedank ik mijn vrienden, en in bijzonder mijn kotgenoot, voor hun grote steun tijdens de studie.

INHOUD

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| SAMENVATTING | 8 |
| INLEIDING | 9 |
| LITERATUURSTUDIE | 10 |
| 1 Inleiding: plantaardige oorsprong en traditioneel gebruik | 10 |
| 1.1 Plantaardige oorsprong | 10 |
| 1.2 Gebruik van berberine in de traditionele Chinese geneeskunde | 10 |
| 1.3 Gebruik van berberine in andere volkse geneeswijzen | 10 |
| 2 Chemisch structuur en fysicochemische eigenschappen | 11 |
| 3 Farmacokinetiek | 12 |
| 3.1 Absorptie | 12 |
| 3.2 First-pass metabolisme en eliminatie | 14 |
| 3.3 Distributie | 14 |
| 3.4 Metabolisatie | 15 |
| 3.5 Eliminatie | 16 |
| 3.6 Conclusie | 18 |
| 4 Farmacodynamiek | 18 |
| 4.1 Anti-inflammatoire effecten | 18 |
| 4.2 Antibacterieel effect | 25 |
| 4.3 Antiprotozoair effect | 28 |
| 4.4 Antiviraal effect | 28 |
| 4.5 Effecten ter hoogte van de darm | 29 |
| 4.5.1 Integriteit van de darmbarrière | 29 |
| 4.5.2 Effect op motiliteit en viscerale pijn van de darm | 31 |
| 4.5.3 Effect op de secretie in de darm | 31 |
| 4.5.4 Effect op de intestinale microbiota | 32 |
| 4.6 Overige effecten | 34 |
| 5 Toxiciteit en cancerogeniciteit | 34 |
| 5.1 Algemene Veiligheid en bijwerkingen | 34 |
| 5.2 Effect op de reproductie | 35 |
| 5.3 Interacties met andere geneesmiddelen | 36 |
| 5.4 Cancerogeniciteit | 36 |
| 5.5 Residuen | 36 |
| 6 Gebruik bij nutsdieren | 37 |
| 6.1 Toepassingen | 37 |
| 6.1.1 Als groeibevorderaar | 37 |
| 6.1.2 Als gezondheidsbevorderend middel | 37 |
| 6.1.3 Als modulator van de acute fase respons | 38 |
| 6.1.4 Preventie en behandeling van enteritis | 38 |
| 6.1.5 Behandeling van <i>Riemerella anatipestifer</i> bij de eend | 40 |
| 6.1.6 Preventie en behandeling van endometritis, mastitis en rumenitis bij het rund | 40 |
| 6.2 Toedieningswijzen | 41 |
| DISCUSIE | 42 |
| REFERENTIELIJST | 44 |

LIJST MET AFKORTINGEN

AKT1/PKB = Protein kinase B

AMPK = AMP-activated protein kinase

AP-1 = Activator protein-1

AQP4 = Aquaporin 4

ATP = Adenosine triphosphate

AUC = Area under the curve

BAX/Bcl-2 = Bcl-2 associated X protein/B-cell lymphoma 2

BRICS = Brazilië, Rusland, Indië, China en Zuid-Afrika

CCL = CC chemokine ligand

CFTR = Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

cGMP = Cyclic guanosine monophosphate

COX-2 = Cyclo-oxygenase 2

CT= Cholera toxine

CXCL = CXC chemokine ligand

CYP450= Cytochroom P450

DSS = Dextran sulfate sodium

EPS = Extracellular polymeric substance

ERK = Extracellular signal-regulated kinase

ETEC = Enterotoxigene *E. coli*

FFA = Free fatty acid receptor

FITC-dextraan = Fluoresceïne isothiocyanaat-dextraan

FtsZ = Filamenting temperature sensitive mutant Z

GST = Glutathion-S-transferase

HDAC = Histone deacetylase

HIF-1 α = Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HO-1 = Heme oxygenase 1

IFN- γ = Interferon-gamma

IgA= Immunoglobuline A

IGF-1 = Insulin-like growth factor

IKK= I κ B α kinase

IL = Interleukine

iNOS= Inducible nitric oxide synthase

I κ B α = Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha

JNK = C-Jun N-terminal kinase

KCNQ1 = Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1

LD₅₀ = Dosis waarbij 50% sterfte optreedt

LG = lichaamsgewicht

LPS = Lipopolysaccharide

LT = Thermolabiel toxine

MAPK = Mitogen-activated protein kinase

MD-2 = Myeloid differentiation factor 2

MDA = Malondialdehyde

MDR = Multidrug efflux pomp
MEK = Mitogen-activated protein kinase kinase
MHV-A59 = Mouse hepatitis virus A59
MIC = Minimum inhibitory concentration
MIC₅₀ = Minimum concentratie waarbij er 50% inhibitie optreedt
MLC = Myosin light chain
MLCK = MLCK: Myosine light chain kinase
MRSA = Methicilline resistente *Staphylococcus aureus*
NF-κB = Nuclear Factor Kappa B
NHE3 = Sodium hydrogen exchanger 3
NO = Stikstofmonoxide
NOD-like receptor = Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor
NQO1 = NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
Nrf2 = Nuclear factor erythroid 2- related factor 2
OCT1 = Organic cation transporter 1
OPG = Oöcyten per gram feces
Pap fimbriae = Pyelonephritis-associated pili fimbriae
PEDV = Porcien epidemisch diarree virus
PGF = Pseudo germ gree
P-gp = P-glycoproteïne
PI3KIII = Class III phosphatidylinositol- 3 kinase
PKA = Protein kinase A
PKG = Protein kinase G
PSM = Phenol-soluble modulines
RSV = Respiratoir syncytieel virus
SCFA = Short-chain fatty acids
SOCS 1 = Suppressor of cytokine signaling
ST = Thermostabiel toxine
STAT = Signal transducer and activator of transcription
STEC/EPEC = Shigatoxineproducerende *E. Coli*/ Enteropathogene *E. coli*
TCM = Traditional Chinese Medicine
Th = T-helpercel
Treg = Regulatorie T-cel
TLR = Toll-like receptor
TNBS = Trinitrobenzenesulfonic acid solution
TNFα = Tumor necrosis factor alpha
TRAF6 = TNF receptor-associated factor 6
UGT = Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase
ZIP14 = Zinc transporter protein 14
ZO-1 = Zonula occludens-1

SAMENVATTING

Berberine is een bitter alkaloïde dat gebruikt werd in de traditionele Chinese geneeskunde bij o.a. gastro-intestinale aandoeningen. In deze masterproef werd geëvalueerd of berberine mogelijks de reductie van het antibioticumgebruik in de intensieve veehouderij kan ondersteunen. Berberine heeft een complexe farmacokinetiek met een lage biobeschikbaarheid ten gevolge van een lage absorptie ter hoogte van de darm, een hoge intestinale en hepatische metabolisatie en een hoge distributie naar de weefsels toe. Het intestinaal microbiom heeft een cruciale rol in zowel de farmacokinetiek als de farmacodynamiek van berberine. De farmacodynamische kenmerken van berberine zijn talrijk. Berberine heeft een anti-inflammatoire werking op zowel de aangeboren als de specifieke immuniteit. Ook Antibacteriële, antiprotozoaire en antivirale eigenschappen worden aan berberine toegeschreven. Daarnaast heeft berberine verschillende effecten op de darm. Berberine heeft een positieve impact op de darmbarrière, de darmmotiliteit, viscerale pijn en het intestinale microbiom. Tevens inhibeert berberine enterotoxine-geïnduceerde secretie. De per orale toediening van berberine lijkt over het algemeen veilig maar bijwerkingen worden vermeld en zijn dosis- en diersoortafhankelijk. Er zijn eveneens zorgen omtrent embryotoxische, immunosuppressieve en carcinogene effecten. Daarom zijn toxicologische studies en residu studies van groot belang. Uit de huidige klinische studies bij de kip en het varken lijkt berberine een beloftevolle molecule als gezondheidsbevorderend middel. Berberine heeft protectieve effecten tegenover verschillende pathogenen, inflammatie en algemene stress ten gevolge van een hoge bezettingsgraad. In het bijzonder lijkt berberine een protectief effect te hebben tegen coccidiose bij de kip, necrotische enteritis bij de kip, *Reimerella anatipestifer* bij de eend en ETEC-diarree bij zoogdieren. Verder onderzoek is echter nodig om deze bevindingen te bevestigen. Verder zijn er indicaties dat berberine mogelijks ook ingezet zou kunnen worden bij bepaalde virale aandoeningen bij zoogdieren, enkele specifieke ontstekingsbeelden bij het rund en als synergist voor antibiotica. Door de bittere smaak van berberine is toediening als wateradditief niet wenselijk.

SUMMARY

Berberine is a bitter alkaloid often used for gastrointestinal disorders in traditional Chinese medicine. In this thesis the use of berberine in intensive agriculture as potential tool to reduce antibiotic usage is evaluated. The pharmacokinetics of berberine are complex due to a low absorption in the gut, a high intestinal and hepatic metabolism and a high distribution in tissues. The intestinal microbiome has a crucial role in both the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of berberine. Berberine has a plethora of pharmacodynamic effects. Berberine has an anti-inflammatory function on both the innate and the specific immunity. Antibacterial, antiprotozoal and antiviral effects are also attributed to berberine. Various effects of berberine on the gut are described. Berberine has a positive impact on the gut barrier, the gut motility, visceral pain and the intestinal microbiome. Finally, berberine inhibits the secretion induced by enterotoxins. A per oral administration of berberine is assumed to be safe but side effects do occur. This toxicity is species and dose dependent. Still concerns about the embryotoxic, immunosuppressive and carcinogenic effect of berberine exists. Toxicologic and residual studies are thus primordial. Current clinical studies in poultry and swine suggest a promising role of berberine in the improvement of general health. It yields protective effects against various pathogens, inflammation and stress due to high-density housing. In particular, berberine has promising protective effects against coccidiosis in poultry, necrotic enteritis in poultry, *Reimerella anatipestifer* in ducks and ETEC diarrhoea in mammals. Still further research is needed to confirm these findings. Some indications exist that berberine could also be beneficial in some viral disorders in mammals, some specific inflammatory disorders in cattle and as antibiotic synergist. Due to the bitter taste berberine is not suitable to be given in the drinking water.

INLEIDING

Antimicrobiële resistentie vormt een stijgende bedreiging voor de volksgezondheid doordat antimicrobiële middelen cruciaal zijn voor het behandelen van levensbedreigende infecties, verschillende chirurgische procedures en het behandelen van infecties bij immuuninsufficiënte individuen. In 2014 werd het aantal mensen dat per jaar sterft aan resistente bacteriële infecties geschat op 700 000 en dit is waarschijnlijk een onderschatting door onderrapportering. Dit cijfer zal in de toekomst nog toenemen (O'Neill, 2016). Hoewel verschillende landen sterk inzetten op de reductie van het antibioticumgebruik werd van 2010 tot 2013 wereldwijd een stijging waargenomen. Hierbij waren China, de Verenigde Staten, Brazilië en India de grootste gebruikers. Er wordt nog een verdere stijging van het antibioticumgebruik verwacht in de BRICS. Dit als gevolg van een verhoogde vleesconsumptie in deze landen en de daarmee samengaande intensieve veehouderij (Van Boeckel et al., 2015). In deze landen worden antibiotica nog vaak ingezet als groeipromotor of als preventie tegen infecties. In Europa is dergelijk gebruik verboden sinds 2006. Recent werd er in Europa ook een verbod ingesteld op profylactisch gebruik van antibiotica in de veehouderij welke in 2022 in werking zal treden (More, 2020). In de Verenigde Staten is het gebruik als groeipromotor verboden sinds 2017 (US Food and Drug Administration, 2016). Door de druk op het antibioticumgebruik t.g.v. de stijgende antimicrobiële resistentie zijn ook wettelijke beperkingen in de BRICS opkomend.

In de veehouderij zijn er dus alternatieven nodig om infecties te vermijden en toch de optimale groei te behalen. Een betere bioveiligheid en een beter management zijn hierbij zeer belangrijk. Hiernaast wordt als aanvulling ook gezocht naar gezondheidsbevorderende voedingssupplementen.

Momenteel wordt er opnieuw richting moleculen afkomstig van natuurlijke bronnen gekeken voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. De natuur vormt een bron voor moleculen met grote chemische diversiteit en complexiteit. Bovendien bevatten ze vaak een specifieke biologische activiteit afkomstig van hun functie in het organisme van oorsprong (Atanasov et al., 2015; Chen et al., 2015b). Bij planten wordt vnl. naar de alkaloiden gekeken. Alkaloiden zijn natuurlijke moleculen die een N-atoom bevatten, een klein moleculairgewicht hebben, gesynthetiseerd worden uit aminozuren en een biologische activiteit bevatten. Er is reeds aangetoond dat verschillende alkaloiden een anti-inflammatoire activiteit hebben, o.a. door het inhiberen van NF- κ B, COX-2 en iNOS (Alves de Almeida et al., 2017). Alkaloiden worden onder de vorm van plantenextracten vaak gebruikt in de traditionele Chinese geneeskunde.

Traditionele Chinese geneeskunde vindt zijn oorsprong 3000 jaar geleden in de Zhou dynastie. Het bestaat uit verschillende onderdelen waarvan kruidengeneeskunde een zeer belangrijk onderdeel is. Het is een volkse geneeskunde gebaseerd op onevenwichten in het lichaam. Sinds de 20^{ste} eeuw wordt deze methode onderzocht op een wetenschappelijke manier, waarbij men vooral de componenten van de gebruikte planten en hun werking onderzoekt. Op deze manier werd in 1960 artemisinine als geneesmiddel voor malaria ontdekt uit *Artemisia annua* (Gu en Pei, 2017). De laatste 20 jaar is er sterke interesse in berberine in het humaan geneesmiddelenonderzoek dankzij een grote variatie aan farmacodynamische effecten waaronder anti-inflammatoire en antidiarree effecten (Habtemariam, 2016). Mogelijks heeft deze molecule eveneens een positieve impact op de gezondheid van nutsdieren.

In deze masterproef wordt onderzocht of berberine ingezet kan worden in de nutsdierensector als gezondheidsbevorderend middel alsook voor enkele andere toepassingen. Eerst wordt de afkomst, de chemische structuur, de farmacokinetiek en de farmacodynamiek van de molecule besproken waarna de toxiciteit en de verschillende mogelijkse toepassingen bij dieren worden toegelicht.

LITERATUURSTUDIE

1 Inleiding: plantaardige oorsprong en traditioneel gebruik

1.1 Plantaardige oorsprong

Berberine werd onbewust reeds vroeg in de geschiedenis ingezet als medicijn bij volkse geneeswijzen, onder de vorm van berberine bevattende planten. Berberine komt voor in verschillende plantengenera. De meest gekende zijn: *Annickia spp.*, *Berberis spp.*, *Chelidonium majus*, *Coptis spp.*, *Corydalis spp.*, *Hydrastis canadensis*, *Mahonia spp.*, *Phellodendron spp.* en *Thalictrum spp.* (Zhou et al., 2011; Neag et al., 2018). De lijst van planten waarin berberine is vastgesteld is echter veel langer. Deze planten komen wereldwijd voor. De wortel(stok) en de schors bevatten de hoogste concentratie aan berberine (Andola et al., 2010). De concentratie berberine in planten van verschillende species is variabel. De concentratie varieert eveneens tussen planten van één species t.g.v. seizoensvariatie en de hoogte waarop de plant groeit (Mikage en Mouri, 1999; Srivastava et al., 2004; Rashmi et al., 2009; Andola et al., 2010).

1.2 Gebruik van berberine in de traditionele Chinese geneeskunde

Het gebruik van planten waarin zich berberine bevindt is het best gekend in de traditionele Chinese geneeskunde (TCM). Er wordt hierbij vaak met combinaties van verschillende kruiden gewerkt, volgens principes van synergisme, vermindering van toxiciteit en het begeleiden van het werkzame bestanddeel naar de juiste plaats in het lichaam (Bensky et al., 2004a; Yuqun, 2011). *Coptis spp.* en *Phellodendron spp.* zijn de belangrijkste berberine bevattende planten in de TCM.

Coptis spp. zijn kruiden met groen tot witte bloemen en komen voor in Amerika en Oost-Azië (Wencai et al., 2001; Dianxiang en Hartley, 2008). Hun wortelstok werd voornamelijk gebruikt bij gastro-intestinale infecties, hepatitis, infecties van de bovenste luchtwegen, huidaandoeningen, externe bloedingen, sepsisbeeld, delirium t.g.v. hoge koorts en insomnia (Bensky et al., 2004b; Zhou et al., 2011). *Phellodendron spp.* zijn bomen die voorkomen in Oost en Zuidoost-Azië waarvan de schors gebruikt wordt voor verschillende infectieuze aandoeningen inclusief infecties van het gastro-intestinaal stelsel, het urogenitaal stelsel en aandoeningen van het bewegingsapparaat (Bensky et al., 2004c).

Andere gebruikte planten in de TCM zijn *Corydalis spp.*, *Berberis spp.*, *Mahonia spp.* en *Thalictrum spp.*. Ze worden gebruikt voor een groot aantal verschillende aandoeningen o.a. voor infecties van de darmen en de lever, urineweginfecties, luchtweginfecties, huidaandoeningen en mondholte aandoeningen (Zhou et al., 2011). *Corydalis spp.* vormen hierop een uitzondering en worden in de TCM gebruikt bij verschillende pijnklachten, vnl. deze in de abdominale regio en deze t.g.v. trauma (Bensky et al., 2004d).

1.3 Gebruik van berberine in andere volkse geneeswijzen

Ook in andere geneeswijzen werden/worden berberine bevattende planten gebruikt waaronder *Hydrastis canadensis*, *Annickia spp.*, *Berberis spp.* en *Chelidonium majus*. *Hydrastis canadensis* is een medicinaal kruid dat voorkomt in Noord-Amerika en gebruikt werd door de Indianen bij pneumonie, tuberculose, conjunctivitis en huidaandoeningen (Foster en Duke, 1990). De schors van *Annickia spp.*, een sierboom uit het regenwoud, wordt gebruikt door de lokale Afrikaanse volkeren bij malaria, tuberculose, infectieziekten met koorts, geelzucht, infecties t.h.v. de lever en de darmen en huidaandoeningen (Versteegh en Sosef, 2007). *Berberis spp.*, worden ook gebruikt in de volkse Indische en Arabische geneeswijzen voor huidaandoeningen, infecties van mondholte en ogen, tandpijn, stoornissen van de lever en de darmen, astma, obesitas, urogenitale infecties en als antidote voor slangenbeten (Kirtikar en Basu, 1998; Dev, 2006). *Chelidonium majus* werd vroeger in Europa gebruikt voor huidaandoeningen en leverstoornissen. Het wordt nu verwerkt in topicale middelen tegen wratten (Committee on Herbal Medicinal Products, 2011).

Er kan besloten worden dat berberine bevattende planten vooral werden/worden ingezet bij verschillende infectieziekten vnl. gesitueerd t.h.v. het gastro-intestinaal en het respiratoir stelsel, alsook bij leverstoornissen en huidaandoeningen.

2 Chemisch structuur en fysicochemische eigenschappen

Berberine is een tetracyclische molecule afgeleid van het aminozuur tyrosine (figuur 1). Het heeft een benzylisocholine basisstructuur en wordt vanuit een reticuline precursor aangemaakt in de plant (Roberts, 1998).

Het is een geurloze molecule met een bittere smaak, die gele kristallen vormt. Het heeft een moleculairgewicht van 336,34 g/mol en heeft een goede stabiliteit. Er wordt namelijk minder dan 5% afbraak vastgesteld over een periode van 6 maanden zowel bij een temperatuur van 25°C als 40°C (Kametani, 1969; Battu et al., 2010).

Berberine is slechts weinig oplosbaar in water.

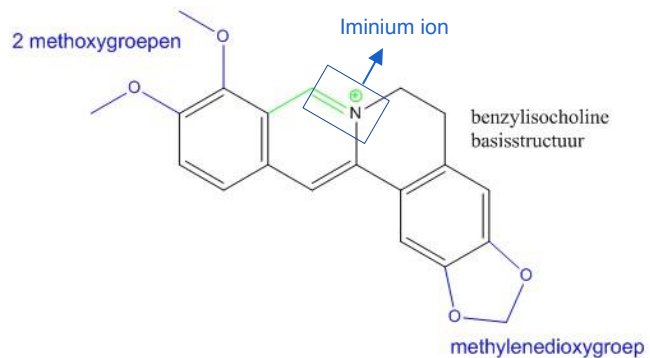
Berberine zouten zoals berberine chloride zijn matig oplosbaar. De oplosbaarheid van

berberine is temperatuurafhankelijk waardoor berberine beter oplosbaar is bij een hogere temperatuur (Battu et al., 2010). Doordat berberine geen ioniseerbare groepen bevat is de oplosbaarheid pH-onafhankelijk (Battu et al., 2010; Spinozzi et al., 2014). De oplosbaarheid is merkbaar beter in fosfaatbuffers. Battu et al. (2010) suggereerde dat door interactie van deze buffers met berberine een beter oplosbaar complex gevormd wordt. Verschillende oplosbaarheden voor berberine chloride in fosfaatbuffer bij pH 7 en 25°C worden gemeld in de literatuur: $1,51 \pm 0,03$ mg/ml en 3,35 mg/ml (Battu et al., 2010; Spinozzi et al., 2014).

Berberine chloride heeft een octanol-water partitiecoëfficiënt van -1.2 volgens Spinozzi et al. (2014) en -1.5 volgens Battu et al. (2010). Dit wijst op een hydrofiel karakter van berberine. Enkel berberrubine, een metaboliet van berberine heeft een duidelijk lipofiel karakter (Spinozzi et al., 2014).

De pKa van berberine is moeilijk experimenteel te bepalen doordat berberine niet ioniseerbaar is en permanent geladen is t.g.v. een iminium ion. In de literatuur worden 2 pKa's vermeld namelijk 15 en 2,47. Hiervan lijkt een pKa van 15 meer waarschijnlijk aangezien een pKa van 2,47 zou wijzen op een gedrag overeenkomstig aan sterk zuur (Spinozzi et al., 2014).

Berberine is dus weinig oplosbaar in water, heeft een hydrofiel karakter en is permanent geladen. Berberine chloride is matig oplosbaar in water. Dit is belangrijk voor de wijze van toediening en de farmacokinetiek van de molecule.



Figuur 1. Structuur van berberine.

3 Farmacokinetiek

De farmacokinetiek van berberine is reeds uitgebreid onderzocht bij knaagdieren en mensen maar er is nog weinig geweten over de farmacokinetiek bij nutsdieren. De farmacokinetiek is eerder complex t.g.v. de betrokkenheid van efflux-pompen, de uitgebreide metabolisatie van berberine en de betrokkenheid van het intestinale microbiom (Pan et al., 2002; Nies et al., 2008; Feng et al., 2015; Alolga et al., 2016; Wang et al., 2017b). Het meest opvallende kenmerk is de lage biobeschikbaarheid van berberine. Deze kan verklaard worden door een beperkte absorptie van berberine t.h.v. de darm, een hoge distributie naar de weefsels toe en een hoog metabolisme waaronder een groot deel first-pass metabolisme (Maeng et al., 2002; Zuo et al., 2006; Liu et al., 2010; Zhang et al., 2011; Tan et al., 2013; Wang et al., 2017a). Het first-pass metabolisme betreft de metabolisatie van berberine nog voor deze toekomt in de systemische circulatie. De farmacokinetiek van berberine wordt schematisch weergegeven in figuur 5.

3.1 Absorptie

Er zijn twee mechanismen voor de absorptie van berberine. Enerzijds wordt berberine zelf geabsorbeerd en anderzijds wordt berberine omgezet in metabolieten door het intestinaal microbiom die op hun beurt eveneens geabsorbeerd kunnen worden.

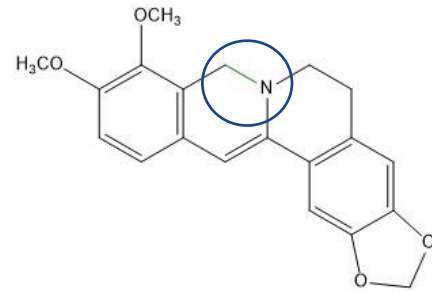
3.1.1 Absorptie van Berberine zelf

De absorptie van berberine is beperkt door een lage tot matige permeabiliteit en doordat berberine een substraat is van P-glycoproteïne (P-gp) (Maeng et al., 2002; Nies et al., 2008; Liu et al., 2010). P-gp is een ATP-afhankelijke efflux-pomp die zich in het apicaal membraan van o.a. het intestinaal epitheel bevindt en zo de absorptie van zijn substraten tegen gaat (Chen et al., 2016b). De absorptie wordt verbeterd door de tijdelijke omzetting naar dihydroberberine welke beter geabsorbeerd wordt (Feng et al., 2015).

De passage door de darmbarrière van berberine is onderzocht via het transport door Caco-2 cellijnen en via het darmlusmodel. Caco-2 monolayers worden gebruikt als model voor het intestinaal epitheel. Bij het darmlusmodel wordt één aan beiderzijds geligeerd stuk dunne darm van een proefdier onder anesthesie gebruikt om de absorptie vanuit de darm te bepalen (Pan et al., 2002; Zuo et al., 2006; Liu et al., 2010). De verschillende gevonden permeabiliteitscoëfficiënten in beide modellen komen overeen met een beperkte passieve absorptie van 1 tot 30% (Artursson en Karlsson, 1991; Fagerholm et al., 1996; Maeng et al., 2002; Liu et al., 2010; Zhang et al., 2011). Deze lage tot matige permeabiliteit kan verklaard worden door de lage lipofiliciteit en de aanwezigheid van een geïoniseerd iminiumion (Battu et al., 2010; Spinozzi et al., 2014).

Daarnaast is berberine een P-gp substraat. Dit is aangetoond d.m.v. het transport doorheen Caco-2 monolayers en genetisch gemodificeerde cellijnen in combinatie met het gebruik van P-gp inhibitoren (Maeng et al., 2002; Nies et al., 2008). Er wordt eveneens een hogere absorptie waargenomen bij het toevoegen van inhibitoren in het darmlusmodel (Pan et al., 2002). P-gp zorgt voor een verslechtering van de reeds beperkte absorptie van berberine.

Doordat berberine weinig wordt opgenomen in de darm komt het sterk in contact met de microbiota. Deze metaboliseren berberine o.a. naar dihydroberberine via een reductiereactie (Feng et al., 2015; Alolga et al., 2016). Hierbij wordt de dubbele binding van het N-atoom omgezet naar een enkele binding waardoor deze molecule niet permanent geïoniseerd is (figuur 2). Hierdoor heeft deze molecule een hogere permeabiliteit waardoor deze beter opgenomen wordt in de darmwand. Dit wordt bevestigd door een 10x groter transport doorheen een Caco-2 monolayer. Eveneens is de concentratie van berberine in het bloed na orale toediening, lager bij ratten waarbij de intestinale microbiota vernietigd werden met antibiotica. Hoewel voor de omvorming tot dihydroberberine, nitroreductases als sleutelenzymen worden aanschouwd kunnen ook andere enzymen zoals azoreductases betrokken zijn. Nitroreductases zijn sterk aanwezig in verschillende darmbacteriën waardoor de omzetting vergelijkbaar zou moeten zijn tussen verschillende diersoorten en individuen. Eens in de darmwand wordt dihydroberberine vnl. op een enzymonafhankelijke manier geoxideerd tot berberine. Vervolgens kan deze worden opgenomen in de bloedbaan (Feng et al., 2015). Deze omzetting is eveneens bevestigd in beagles (Feng et al., 2018).



Figuur 2. Structuur van dihydroberberine.

3.1.2 Absorptie van metabolieten gevormd door microbiota

In een studie van Qiu et al. (2008) werden er 4 uur na toediening geen metabolieten van berberine teruggevonden in de darm. Er zijn echter wel metabolieten gevonden bij anaerobe incubatie van berberine met intestinale bacteriën bij een recentere studie. De gevonden metabolieten zijn hierbij dihydroberberine en metabolieten die reeds bekend waren als fase-I-metabolieten van berberine (Alolga et al., 2016). Microbiota zouden dus eveneens een rol kunnen spelen in de fase-I-metabolisatie van berberine. Echter zou de samenstelling van de microbiota hier wel een merkelijke invloed op hebben (Alolga et al., 2016). Zeer recent is er nog een andere veel belovende metaboliet ontdekt namelijk oxyberberine welke via oxidatie gevormd wordt (Li et al., 2020). Deze metabolieten zouden kunnen opgenomen worden in de bloedbaan en kunnen mogelijks ook een activiteit uitoefenen in het lichaam. Verder onderzoek zal nodig zijn om het belang van dit metabolisme op de farmacokinetiek van berberine in kaart te brengen.

3.1.3 Totale absorptie

Hoewel de absorptie van berberine zelf eerder laag is, wordt deze gecompenseerd door de aanmaak van dihydroberberine. Dihydroberberine vormt een soort overgangsmetaboliet om de biobeschikbaarheid van berberine zelf te verbeteren. De biobeschikbaarheid na absorptie in de darm wordt geschat op 44%. Er wordt namelijk 36 uur na intragastrische toediening 56% van de dosis teruggevonden in de feces en de darminhoud (Liu et al., 2010). Hiernaast worden mogelijks ook fase-I-metabolieten en oxyberberine gevormd door de intestinale microbiota welke mogelijks ook worden opgenomen. Aangezien de intestinale microbiota een rol hebben in de farmacokinetiek van berberine, kunnen factoren die het microbiom beïnvloeden (ziekteprocessen, antibioticagebruik, diersoortverschillen, individuerschillen) ook de farmacokinetiek van berberine beïnvloeden. Zo wordt een verhoogde activiteit van nitroreductases gevonden bij biggen met *E. coli* diarree. Deze verhoging kan er voor zorgen dat er meer dihydroberberine wordt gevormd, wat mogelijks kan leiden tot een hogere biobeschikbaarheid (Liu et al., 2019b). In een andere studie wordt er bij biggen met *E. coli* diarree inderdaad een hogere absorptie van berberine vastgesteld via een darmlusmodel. Dit kan echter ook een gevolg zijn van een verhoogde darmpermeabiliteit (Ling et al., 2018).

3.2 First-pass metabolisme en eliminatie

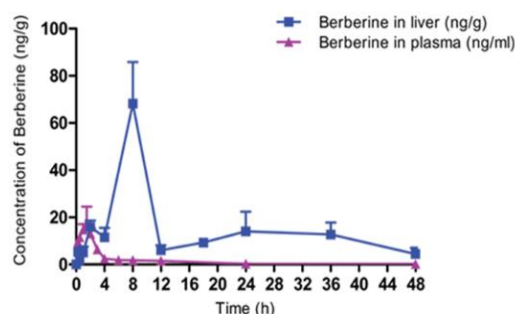
Berberine heeft een lage totale orale biobeschikbaarheid van minder dan 1% waarbij twee waarden vermeld worden: 0,36% en 0,68% (Liu et al., 2010; Chen et al., 2011). Naast de beperkte absorptie draagt ook metabolisatie t.h.v. de darm en lever alsook de biliaire excretie hiertoe bij. Het first-pass-effect is cijfermatig in kaart gebracht door de AUC van verschillende toedieningswijzen te vergelijken (intragastrische, intraduodenale, portale en intraveneuze toediening). De AUC is een maat voor de aanwezige concentratie over een bepaald tijdsverloop. Het first-pass-effect van de maag is verwaarloosbaar klein. Het intestinaal first-pass-effect is daarentegen heel groot waarbij slechts 1,16% van de hoeveelheid dat in de darmwand werd opgenomen terecht komt in de portale vene. Passage in de lever zorgt dat 71,8% van de hoeveelheid aanwezig in de portale vene naar de systemische circulatie gaat. Ter hoogte van de lever zorgen zowel metabolisatie als biliaire excretie voor reductie van berberine. De beperkte absorptie en het first-pass metabolisme t.h.v. de darm spelen dus de grootste rol in de lage biobeschikbaarheid van berberine (Liu et al., 2010).

3.3 Distributie

Ondanks de lage concentratie van berberine in het bloed, kent berberine wel een sterke distributie naar verschillende weefsels. Het betreft lever, nier, spier, longen, hersenen, hart, pancreas en vet. De hoogste concentratie wordt gevonden in de lever en de laagste in het vet (Liu et al., 2010; Tan et al., 2013). De distributie verloopt over het algemeen snel, waarbij er reeds berberine wordt waargenomen een kwartier na orale toediening. De concentratie van berberine is significant groter in de lever en de nier dan de concentratie in het bloed. Bij orale toediening van berberine is de AUC_{0-48u} van berberine 10x tot 70x zo groot in de lever en 5x tot 50x zo groot in de nier bij verschillende farmacokinetische onderzoeken (Liu et al., 2010; Tan et al., 2013).

Ook de metabolieten kennen een sterke distributie naar de lever toe. In diezelfde farmacokinetische onderzoeken is de AUC_{0-48u} van al de metabolieten samen in de lever 29x tot 50x groter dan die van berberine in het bloed. Dit resultaat benadrukt de grote aanwezigheid van berberinemetabolieten in de lever (Liu et al., 2010; Tan et al., 2013). Daarom is van belang naast de activiteiten van berberine zelf ook de activiteiten van de metabolieten te onderzoeken. Bij Tan et al. (2013) bestaan de gevonden metabolieten enkel uit fase-I-metabolieten waarvan de meerderheid uit berberrubine en thalifendine bestond. Dit in tegenstelling tot een andere studie waarbij demethyleneberberine en berberrubine de voornaamste metabolieten zijn in de lever (Liu et al., 2010). Er worden ook metabolieten gevonden in de nier, de longen en het hart (Liu et al., 2010; Tan et al., 2013). In het bloed worden voornamelijk geconjugeerde metabolieten gevonden (Liu et al., 2010).

De concentratie van berberine in de lever heeft twee pieken, namelijk 8 en 24 uur na toediening (figuur 3). Na de eerste piek is er een sterke daling, waarna op 12 u na toediening de concentratie van berberine weer toeneemt. Dit kan mogelijks wijzen op een enterohepatische circulatie (Tan et al., 2013). Onderzoek met radioactief jood-gelabelde berberine welke intraveneus is toegediend, wijst eveneens richting deze conclusie (Li et al., 2005). Ook een enterohepatische circulatie van de fase-I-metabolieten wordt vermoed. Een onderzoek welke de farmacokinetiek heeft vergeleken tussen PGF ratten en conventionele ratten toont een hogere $AUC_{0-36/48u}$ en een langere gemiddelde transitijd van de metabolieten aan bij conventionele ratten.



Figuur 3. Distributie van berberine in plasma en in de lever (Uit: Tan et al. 2013).

De auteurs stelden de hypothese voorop dat de geglucuronideerde metabolieten, uitgescheiden via het gal, omgezet worden door het intestinaal microbioom in fase-I-metabolieten welke dan opnieuw kunnen worden opgenomen (Zuo et al., 2006).

3.4 Metabolisatie

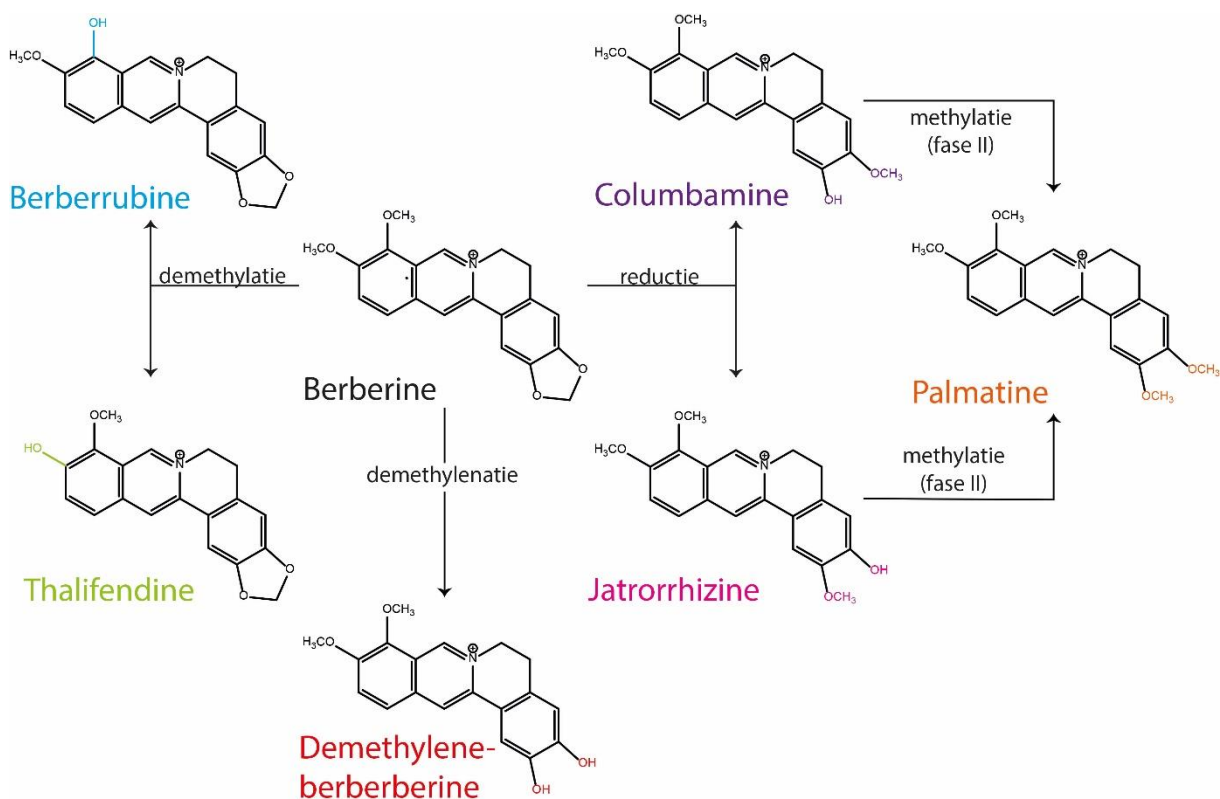
Berberine wordt op verschillende manieren gemetaboliseerd waarbij demethylatie en, demethylenatie de voornaamste reacties zijn. Hierna worden deze metabolieten vnl. geconjugeerd met glucuronzuur en sulfaatzuur tot fase-II-metabolieten. Zowel de fase-I als fase-II-metabolisatie vindt plaats t.h.v. de darm en de lever en dragen bij tot de lage orale biobeschikbaarheid van berberine (Liu et al., 2009; Guo et al., 2011a; Li et al., 2011b).

3.4.1 Fase-I-reacties

De voornaamste metabole reacties worden afgebeeld in figuur 4 en zijn:

- Demethylatie van berberine tot berberrubine en thalifendine waarbij één methoxygroep (-OCH₃) omgezet wordt in een hydroxylgroep (-OH)
- Demethylenatie tot demethyleneberberine waarbij de methylgroep (-CH₃) van de methylenedioxygroep gehaald wordt en er dus 2 hydroxylgroepen overblijven
- Reductie tot columbamine en jatrorrhizine waarbij de methylenedioxygroep gesplitst wordt in een hydroxylgroep en een methoxygroep (Zuo et al., 2006; Qiu et al., 2008; Liu et al., 2009; Guo et al., 2011a; Li et al., 2011b).

Demethylatie en demethylenatie zijn kwantitatief de belangrijkste reacties. Hydroxylatie van berberine en verdere demethylatie van jatrorrhizine en columbamine worden eveneens beschreven (Qiu et al., 2008; Guo et al., 2011a; Ma et al., 2013)



Figuur 4. Voornaamste fase-I-reacties en methylatie van berberine.

Deze fase-I-reacties worden gekatalyseerd door CYP450 enzymen. Door *in vitro* incubatie met recombinante humane CYP en incubatie met levermicrosomen samen met gekende inhibitoren zijn de belangrijkste enzymen als volgt gerangschikt: CYP2D6 > CYP1A2 > CYP3A4 voor de demethylatie en demethylenatie bij de mens.

Diersoortverschillen spelen hierbij echter ook een rol daar bij de muis CYP3A4 een grotere rol lijkt te hebben dan bij de mens (Guo et al., 2011a; Li et al., 2011b). De relatieve bijdrage van de verschillende CYP450 enzymen is eveneens verschillend tussen de reacties (Li et al., 2011b). Bij varkens en herkauwers zijn gelijkaardige CYP450 soorten aanwezig maar de coderende genen, de substraat specificiteit, de relatieve expressie en de activiteit ervan zijn verschillend. Het varken gelijkt hierbij het meest op de mens (Fink-Gremmels, 2008). Bij pluimvee zijn eveneens homologe CYP vermeld voor CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4 (Diaz et al., 2010; Hu, 2013).

3.4.2 Fase-II-reacties

De fase-I-metabolieten worden op drie manieren verder verwerkt: glucuronzuurconjugatie, sulfaatconjugatie en methylering. Glucuronzuurconjugatie en sulfaatconjugatie worden voor vele fase-I-metabolieten beschreven. Hierbij wordt glucuronzuur of sulfaat toegevoegd aan de metabolieten (Zuo et al., 2006; Qiu et al., 2008; Liu et al., 2009; Guo et al., 2011a; Ma et al., 2013). Jatrorrhizine en columbamine kunnen gemethyleerd worden tot palmatine, waarbij de enige hydroxylgroep gemethyleerd wordt tot een methoxygroep (Ma et al., 2013). Deze methylering wordt weergegeven in figuur 4.

UGT1A1 en UGT2B1 worden als enzymen voor de glucuronzuurconjugatie van demethyleberberine en berberrubine gesuggereerd. Hierbij zou vnl. UGT1A1 een dominante rol hebben (Liu et al., 2009). De belangrijkste enzymen betrokken bij sulfaatconjugatie en methylering zijn tot op heden niet onderzocht voor berberine.

De verschillende reacties zijn duidelijk beschreven en blijken vergelijkbaar te zijn tussen mens en knaagdieren (Guo et al., 2011a). Echter is het relatieve belang van de reacties en metabolieten erg variabel over de studies heen. Zo zijn er verschillen gevonden tussen verschillende toedieningsroutes, dosissen, diersoorten, detectiemethoden en isolatietechnieken (Liu et al., 2009, 2010; Guo et al., 2011a).

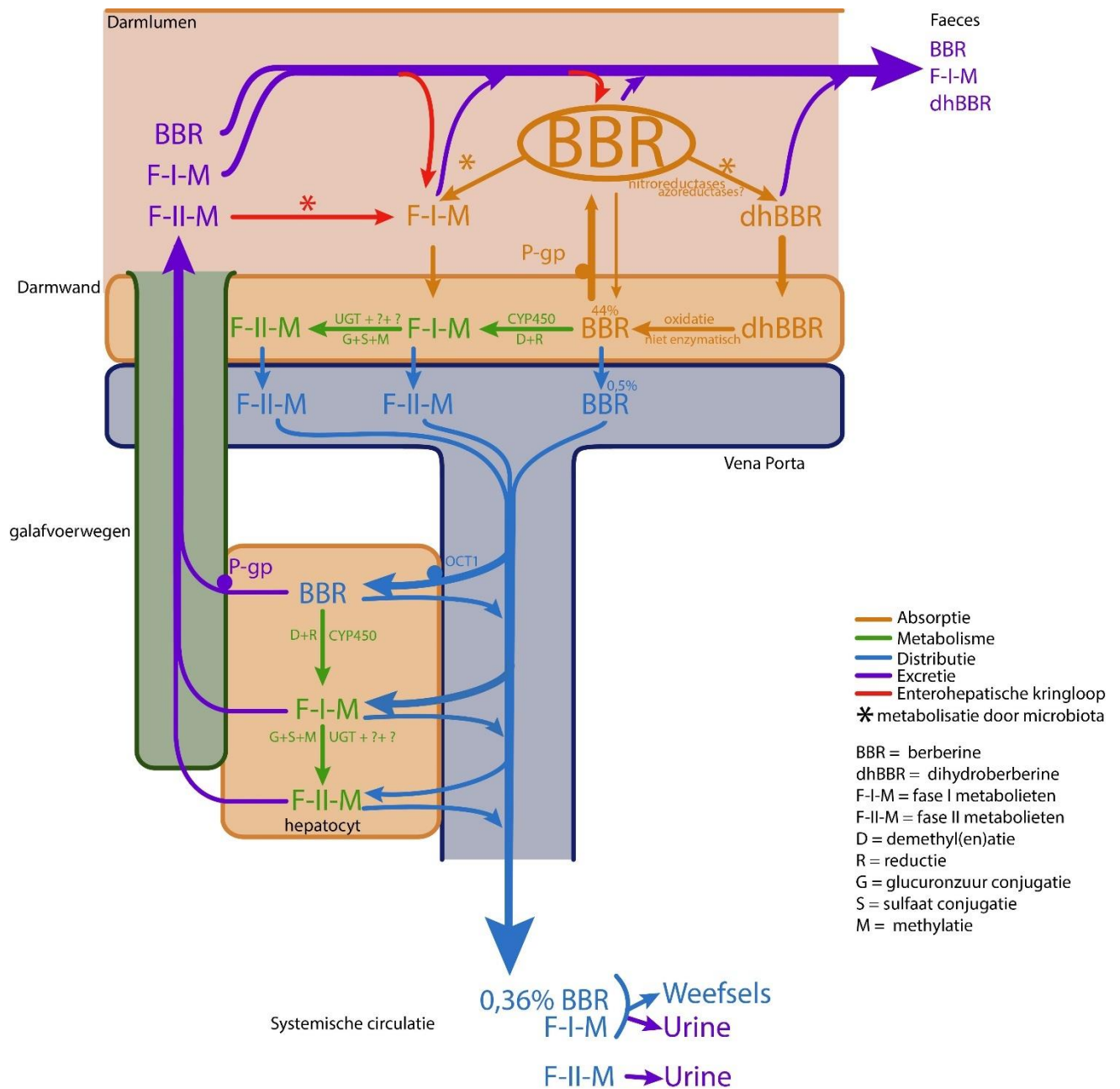
3.4.3 Plaats

Zoals eerder vermeld draagt metabolisatie bij tot het first-pass metabolisme waarvan het intestinale first-pass-effect het grootste is. Zowel de vorming van fase-I-metabolieten als fase-II-metabolieten zijn aangetoond na zowel incubatie met hepatocyt celfracties als enterocyt celfracties waardoor zowel de lever als de darm metabolisatieplaatsen zouden zijn voor berberine (Liu et al., 2009, 2010; Guo et al., 2011a; Li et al., 2011b). Dit bevestigt de belangrijke rol van de darm in het first-pass-effect.

3.5 Eliminatie

Berberine wordt op zichzelf en onder de vorm van metabolieten uitgescheiden in urine en feces. Hierbij bevat de feces zowel de niet opgenomen fractie als de fracties uitgescheiden via gal. Als de niet opgenomen fractie buiten beschouwing wordt gelaten is de voornaamste excretieweg urine (Li et al., 2005; Ma et al., 2013). Toch is ook eliminatie via gal van belang (Nies et al., 2008; Tsai en Tsai, 2004). Ook bij de excretie zijn verschillende transporters betrokken (Nies et al., 2008).

Slechts een beperkt percentage van een per oraal gegeven dosis berberine wordt 48u na toediening teruggevonden in de excreta (feces en urine) onder vorm van berberine of zijn metabolieten. Naast het overblijven van een residuele dosis in de weefsels wordt ook de hypothese naar voor geschoven dat berberine in kleine stukken wordt gefragmenteerd die eveneens uitgescheiden worden via de urine maar die niet steeds gedetecteerd kunnen worden. In urine wordt tot 100x meer uitgescheiden dan in gal (Ma et al., 2013). In urine en in gal worden zowel ongeconjugeerde metabolieten gevonden (fase-I-metabolieten + palmatine) als geglucuroneerde metabolieten (Tsai en Tsai, 2004; Guo et al., 2011a; Ma et al., 2013). Opmerkelijk worden in feces naast sulfaatconjugaten geen andere geconjugeerde metabolieten gevonden (Guo et al., 2011a; Ma et al., 2013). Dit zou erop kunnen wijzen dat de geconjugeerde metabolieten omgevormd worden tot ongeconjugeerde metabolieten door het intestinaal microbiom en versterkt de hypothese van een enterohepatische kringloop.



Figuur 5. Schema met de huidige kennis van de farmacokinetiek van berberine. Het oranje ovaal stelt de ingenomen dosis berberine voor en is tevens de start van het schema.

De rol van P-gp en de Organic Cation Transporter 1 (OCT1) is aangetoond in de excretie van gal. Berberine is een substraat van beide (Maeng et al., 2002; Pan et al., 2002; Tsai and Tsai, 2004; Nies et al., 2008). OCT 1 komt basolateraal voor in de hepatocyten (Nies et al., 2008). P-gp komt naast apicaal in het darmepitheel ook voor in de apicale cellen van de hepatocyten naar de galgangen toe (Nies et al., 2008; Chen et al., 2016b). Hierbij zorgt OCT 1 voor opname van berberine in de hepatocyten en P-gp voor excretie naar de galgang (Nies et al., 2008). Welke transporters instaan voor de excretie van de metabolieten van berberine is nog niet geweten.

Berberine wordt dus vnl. uitgescheiden in de urine, zowel onder de vorm van fase-I en fase-II-metabolieten als onder de vorm van berberine zelf. Berberine en zijn metabolieten worden eveneens in de feces uitgescheiden via gal waar OCT 1 en P-gp een grote rol hebben. Hoewel de excretie via gal in verhouding met urine veel kleiner is, is deze wel van belang. Deze zou namelijk kunnen zorgen voor een enterohepatische kringloop.

3.6 Conclusie

De farmacokinetiek van berberine is eerder complex en er zijn veel factoren die deze beïnvloeden.

- De intestinale microbiota, die berberine metaboliseren, variëren tussen verschillende individuen en diersoorten en kan beïnvloed worden door ziekteprocessen, inname van antibiotica, enz. Hierdoor kan de hoeveelheid opgenomen berberine alsook de hoeveelheid metabolieten beïnvloed worden.
- De wijze van toediening en dosis kunnen het relatief belang van verschillende metabolieten wijzigen.
- Diersoortverschillen in relatieve expressie, activiteit en substraat specificiteit van verschillende CYP450 enzymen zorgen voor verschillen in het relatieve belang van de metabolieten alsook de beschikbare concentratie van berberine zelf.
- Gelijktijdige inname van P-gp, OCT1 en CYP-substraten of inhibitoren hebben een invloed op de absorptie, eliminatie en de metabolisatie van berberine.

Dit in acht genomen is verder farmacokinetische onderzoek bij nutsdieren noodzakelijk alsook verder onderzoek naar de beïnvloeding van verschillende ziekteprocessen en verschillen in CYP450 en andere enzymen.

4 Farmacodynamiek

4.1 Anti-inflammatoire effecten

De effecten van berberine zijn onderzocht in verschillende diermodellen waarbij lipopolysaccharide (LPS) gebruikt werd om een acute inflammatoire respons uit te lokken. LPS is een bestanddeel van de wand van gramnegatieve bacteriën zoals *E. coli* en *Salmonella spp.*. Berberinebehandeling kan in dergelijke modellen voor een symptomatische verbetering zorgen. Zo zorgt berberine voor een hoger aantal overlevende muizen na intraperitoneale toediening van LPS (Chu et al., 2014). Ook de morfologische schade van de darm is merkbaar minder door een behandeling met berberine na een LPS toediening (Li et al., 2011a). Het pro-inflammatoire effect van LPS in een mastitis model wordt sterk verminderd waarbij de ontstekingscelinfiltratie in de wanden van het uierklierweefsel gereduceerd is (Wang et al., 2018). Tot slot kan berberine de effecten van intraperitoneaal toegediend LPS op de gewichtsaanzet, eetlust en voederconversie bij kippen sterk reduceren (Shen et al., 2010; Yang et al., 2019).

Er zijn ook andere modellen gebruikt om het anti-inflammatoir effect van berberine aan te tonen, zoals bijvoorbeeld een geïnduceerde colitis met irriterende stoffen (TNBS en DSS) bij muizen, welke model staat voor ulceratieve colitis (Li et al., 2015; Zhu et al., 2019a). Hierbij wordt een verminderd gewichtsverlies, een verbeterd morfologisch uitzicht en een verminderde histologische inflammatie van de darmwand waargenomen (Yan et al., 2012; Kawano et al., 2015; Li et al., 2015; Zhu et al., 2019a). Na een operatie met beschadiging van de mucosa van het caecum en het toedienen van berberine in de buik worden minder vergroeiingen waargenomen alsook minder histologisch zichtbare inflammatie (Zhang et al., 2014). Toediening van berberine kan het gewichtsverlies, de zwelling en de histologische schade reduceren in een model voor reumatoïde artritis bij de rat (Wang et al., 2017c).

Berberine oefent dit anti-inflammatoir effect uit door op verschillende niveaus van het immuunsysteem in te werken. Het werkt in op zowel de aangeboren als de specifieke immuniteit. Berberine werkt voornamelijk in op de intracellulaire signaaltransductie pathways van verschillende celtypen waaronder macrofagen, dendritische cellen, epitheelcellen en T-helper cellen (Feng et al., 2012; Yang et al., 2013; Liu et al., 2018). Op deze manier kan berberine de productie van pro-inflammatoire cytokines verlagen, de oxidatieve stress verlagen, de infiltratie van cellen t.h.v. de ontstekingsplaats verlagen en de differentiatie van macrofagen en T-helper cellen sturen naar enerzijds M2 type macrofagen en anderzijds Th2 en regulatoire T-helper cellen (Mo et al., 2014; Cui et al., 2018; Zhu et al., 2019a; Lin et al., 2019).

4.1.1 Epitheelcellen en macrofagen

Macrofagen activeren de inflammatierespons door via “pattern recognition receptors” bepaalde moleculaire structuren te herkennen die onderdeel zijn van pathogenen. Ook epitheelcellen zijn hiertoe in staat. Deze receptoren zijn vnl. Toll like receptoren (TLR) en NOD-like receptoren. Een zeer bekend voorbeeld is TLR4 welke samen met een andere molecule (MD-2) een complex vormt. Dit complex bindt LPS. Er zijn echter nog andere TLRs die andere bestanddelen van pathogenen herkennen. Na herkenning vindt een cascaderactie plaats welke aanleiding geeft tot de productie van verschillende pro-inflammatoire cytokines waarvan IL-1 β , IL-6 en TNF- α de belangrijkste zijn (Maldonado-Contreras en McCormick, 2011; Tizard, 2012a). Deze zorgen voor het aantrekken van neutrofielen en andere macrofagen. Macrofagen worden eveneens gestimuleerd door de cytokines tot fagocytose, het uitstoten van toxische stoffen zoals zuurstofradicalen, en de productie van meer cytokines. Ze trekken ook andere macrofagen en dendritische cellen aan. Deze cytokines stimuleren ook de bloedtoevoer naar de betrokken plaats zodat de leukocytenmigratie gefaciliteerd wordt (Tizard, 2012b). Deze inflammatiereactie heeft als doel de pathogenen te vernietigen maar veroorzaakt ook weefselschade en heeft een energetische kost. In de darm kan dit ervoor zorgen dat de wand meer permeabel wordt en vervolgens gevoeliger is voor andere pathogenen waardoor de situatie snel kan verergeren. Het verhoogde energieverbruik door het immuunsysteem zorgt voor een daling van de gewichtsaanzet tot gewichtsverlies in productiedieren. Hierboven hebben de cytokines ook een centraal effect en veroorzaken ze o.a. koorts en anorexie (Tizard, 2012b). De cytokines hebben dus een cruciale rol in het opwekken van de inflammatierespons. Hun productie wordt gereguleerd door verschillende cellulaire signaalmechanismen. Berberine kan hierbij verschillende pathways beïnvloeden en zo de pro-inflammatoire respons onderdrukken. Deze beïnvloeding op de signaaltransductiepathways, alsook de gevolgen voor de inflammatiereactie worden schematisch weergegeven in figuur 6.

4.1.1.1 Signaaltransductie

4.1.1.1.1 NF- κ B pathway

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) betreft een transcriptiefactor welke de transcriptie van een heel gamma van genen betrokken bij de immuunrespons kunnen initiëren. Dit zijn o.a. genen voor cytokines, chemokines, induceerbare genen zoals iNOS en COX-2, anti-apoptotische factoren en adhesiemoleculen (Tizard, 2012c; Liu et al., 2017). De expressie van deze genen zorgt voor de initiatie van een pro-inflammatoire respons. Activatie van NF- κ B kan via verschillende signalen en hun cascadereducties getriggerd worden. Een voorbeeld hiervan is de binding van LPS aan het TLR4-MD2 complex. Deze binding initieert een cascadereductie die resulteert in de activatie van I κ B α kinase (IKK). Dit is een enzyme die I κ B α fosforyleert. I κ B α bevindt zich in het cytosol en vormt daar een complex met NF- κ B. De fosforylatie van I κ B α zorgt voor een dissociatie van dit complex waardoor NF- κ B loskomt. Deze gaat vervolgens naar de celkern waar het zijn rol als transcriptiefactor kan vervullen (Lu et al., 2008; Tizard, 2012c; Liu et al., 2017).

In modellen voor LPS geïnduceerde enteritis, ulceratieve colitis en bij viscerale chirurgie vindt een verhoging van nucleair NF- κ B plaats. Deze verhoging kan in verschillende onderzoeken zowel *in vivo* bij knaagdieren als *in vitro* gereduceerd worden door berberine (Lee et al., 2010; Li et al., 2011a; Chu et al., 2014; Mo et al., 2014; Liu et al., 2018; Wang et al., 2018; Zhu et al., 2019a). Bij kippen die over een verloop van 7 dagen blootgesteld worden aan LPS kan berberine de hoeveelheid mRNA van NF- κ B verlagen in de lever (Yang et al., 2019). In pensepitheelcellen gestimuleerd met LPS heeft berberine een verlagend effect op de fosforylatie van NF- κ B (Zhao et al., 2019).

Eveneens wordt in enkele studies een verlaging van het gefosforyleerd I κ B α waargenomen als gevolg van een berberinebehandeling (Lee et al., 2010; Yan et al., 2012; Wang et al., 2018). Dit is ook het geval in pensepitheelcellen blootgesteld aan zowel LPS als berberine (Zhao et al., 2019). Zowel NF- κ B en I κ B α zouden dus een target kunnen zijn van berberine, hoewel ook alle signaalmoleculen die deze beïnvloeden een target kunnen zijn. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS 1), een regulator eiwit welke o.a. de NF- κ B signalisatie inhibeert wordt ook als een target van berberine vernoemd. In een ulceratief colitis muismodel wordt een hogere mate van dit eiwit gevonden in de macrofagen van muizen behandeld met berberine (Liu et al., 2018).

4.1.1.1.2 AP-1 pathway

Activator protein 1 (AP-1) is net zoals NF- κ B een transcriptiefactor. Deze kan ook via verschillende triggers geactiveerd worden, zoals bijvoorbeeld via TLR4 stimulatie. Na TLR4 stimulatie zal dezelfde cascade die IKK activeert, ook mitogen-activated protein kinases (MAPKs) activeren. Deze kinase enzymen activeren AP-1 welke vervolgens de transcriptie van diverse pro-inflammatoire genen kunnen stimuleren. De activatie van MAPKs, geïnduceerd door bijvoorbeeld LPS, kan deels gereduceerd worden door berberine (Lee et al., 2010; Feng et al., 2012; Yan et al., 2012; Lee et al., 2013; Zhang et al., 2014; Hu et al., 2019; Zhao et al., 2019).

4.1.1.1.3 TLR4-MD-2 Receptor

Naast de reeds vermelde signaaltransductiemoleculen wordt ook MD-2 als potentieel target van berberine beschouwd. Berberine zou een antagonist zijn van deze receptor en zo de initiatie van de vorige twee pathways inhiberen. MD-2 bindt LPS en zorgt er zo voor dat LPS aan TLR4 kan binden. Via moleculaire docking studies is aangetoond dat er zich tot drie berberine moleculen in de opening van MD-2 kunnen bevinden. Op die manier wordt de binding van LPS hieraan verhindert en zo ook de verdere binding van LPS aan TLR4 (Chu et al., 2014).

Daarnaast wordt in pensepitheelcellen gestimuleerd met LPS en blootgesteld aan berberine een verlaging van de expressie van TLR4 waargenomen (Zhao et al., 2019). Dit wordt eveneens opgemerkt in het ileum van muizen blootgesteld aan LPS (Li et al., 2011a). Ook dit resulteert in een verminderde stimulatie van de verdere cascadereducties.

4.1.1.1.4 AMPK – Nrf2 pathway

AMP-activated protein kinase (AMPK) heeft een rol in het energiemetabolisme van de cel en nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is een transcriptiefactor die de transcriptie faciliteert van antioxidanta. Mo et al. (2014) suggereren dat AMPK-activatie zorgt voor een activatie van Nrf2. Berberine kan *in vitro* AMPK activeren door de AMP/ATP ratio te verhogen. Daarnaast is er ook een verhoging van het nucleair en het geactiveerde Nrf2 vastgesteld samen met een verhoging van genen voor antioxidanta namelijk HO-1, GST, NQO1 (Mo et al., 2014). Op deze manier zou berberine de oxidatieve reactie die deel uitmaakt van de inflammatoire respons kunnen remmen. Een verlaging van het nucleair Nrf2 is eveneens waargenomen in de Caco-2 cellijn (Jing et al., 2018).

4.1.1.2 Gevolgen voor de inflammatie

De inhibitie van NF- κ B en AP-1 leidt tot verlaagde productie van cytokines, chemokines, adhesiefactoren en induceerbare genen.

4.1.1.2.1 IL-6, IL-1 β en TNF α

Diverse onderzoeken, zowel *in vivo* als *in vitro*, hebben een verlaging van pro-inflammatoire cytokines kunnen vaststellen na een berberinebehandeling bij een inflammatoir proces (LPS geïnduceerde enteritis en mastitis, ulceratieve colitis, viscerale chirurgie en reumatoïde artritis). Berberine kan hierbij IL-6, IL-1 β en TNF α verlagen (Jeong et al., 2009; Lee et al., 2010; Yan et al., 2012; Chu et al., 2014; Mo et al., 2014; Zhang et al., 2014; Li et al., 2015; Wang et al., 2017c; Liu et al., 2018; Wang et al., 2018; Lin et al., 2019; Zhu et al., 2019a).

Specifiek bij de kip kan eveneens een verlaging van TNF- α en IL-1 β vastgesteld worden na berberine supplementatie bij dieren blootgesteld aan LPS (Shen et al., 2010; Yang et al., 2019). Yang et al. (2019) stellen geen verlaging van IL-6 vast bij berberine supplementatie. Daarentegen wordt dit werd waargenomen door Shen et al. (2010). Een verlaging van de mRNA expressie van deze drie cytokines kan eveneens vastgesteld worden na berberinebehandeling van pensepitheelcellen gestimuleerd met LPS (Zhao et al., 2019).

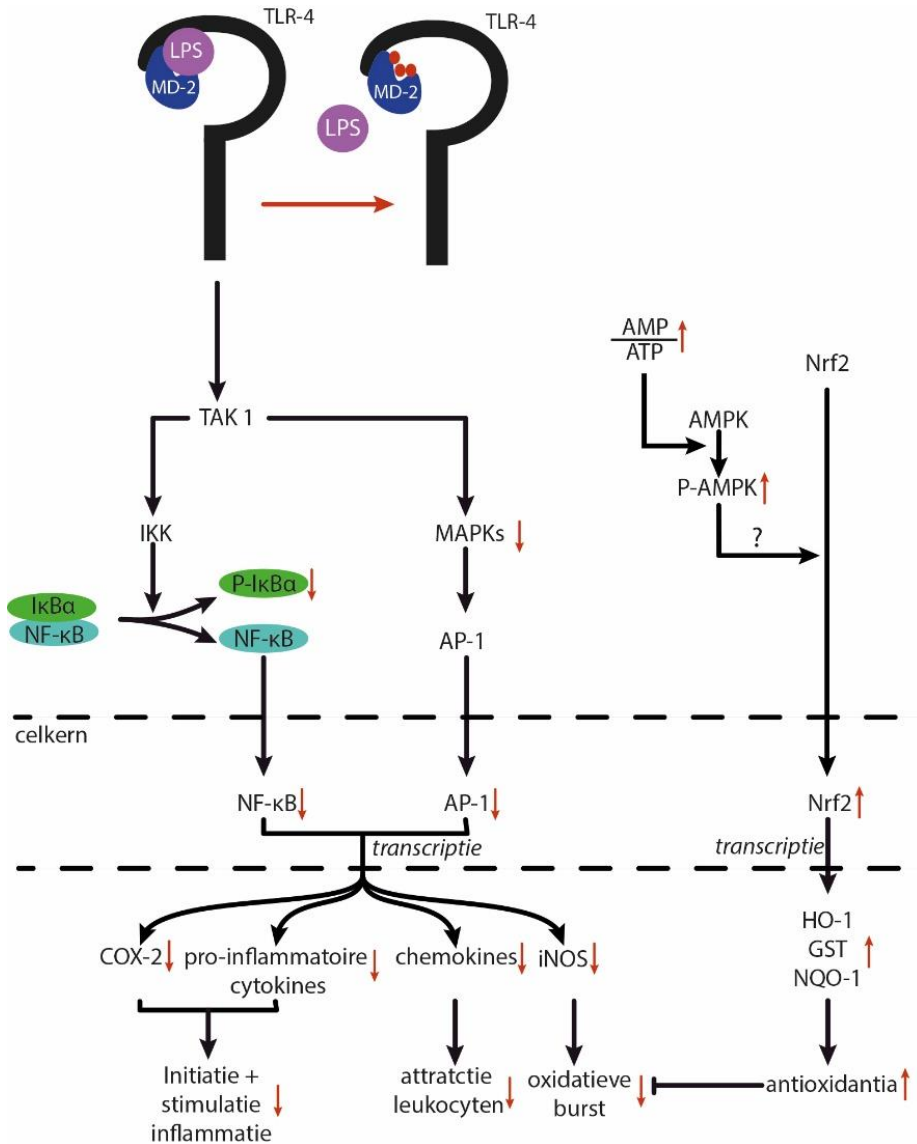
Deze cytokines initiëren en activeren de inflammatierespons door andere immuuncellen aan te trekken en te activeren, de productie van acute fase proteïnen in de lever te stimuleren, de adhesie van endotheelcellen te stimuleren zodat witte bloedcellen kunnen uittreden, collageen synthese te stimuleren, de bloedvloeit te stimuleren en de neutrofielencapaciteit te verhogen. Naast de neutrofielen te stimuleren om cytotoxische stoffen te produceren is TNF- α bovendien zelf cytotoxisch. Deze cytokines werken ook in op de hersenen waardoor ze lethargie en verminderde eetlust veroorzaken en mobiliseren aminozuren uit spieren waardoor pijn en vermoeidheid ontstaat (Tizard, 2012b). Door deze cytokines te onderdrukken zal de immuunrespons veel beperkter zijn.

4.1.1.2.2 IL-12 en IFN- γ

Een ander cytokine die onderdrukt wordt door berberine is IL-12 (Liu et al., 2018; Zhu et al., 2019a). Deze vormt een brug tussen het aangeboren en het adaptieve immuunsysteem. Het faciliteert namelijk de Th1-cel differentiatie en stimuleert de IFN- γ productie in cytotoxische T-cellen en natural killer cellen (Zundler en Neurath, 2015). IFN- γ wordt eveneens in lagere hoeveelheden teruggevonden na berberinebehandeling (Yan et al., 2012; Kawano et al., 2015; Li et al., 2015). IFN- γ heeft verschillende activiteiten waaronder de stimulatie van antigenpresentatie, de differentiatie van T-helpercellen naar Th1-cellen, de stimulatie van de antivirale capaciteit van natural killer cellen en cytotoxische T-cellen en de stimulatie van de fagocytotische capaciteit van macrofagen (Schroder et al., 2004).

4.1.1.2.3 Chemokines

Ook chemokine-expressie wordt verlaagd bij inhibitie van NF- κ B en AP-1. Zoals verwacht is er dan ook een reductie aangetoond van CXCL2, CXCL1 en CCL2 t.g.v. berberine (Jeong et al., 2009; Li et al., 2011a; Yan et al., 2012; Lin et al., 2019). Deze stoffen trekken andere leukocyten aan naar de plaats van ontsteking waarbij CXCL1 en CXCL2 vnl. neutrofielen aantrekken en CCL2 voornamelijk macrofagen aantrekt (Tizard, 2012b). Berberine inhibeert dus eveneens de aantrekking van leukocyten.



Figuur 6. Schematische weergave van de invloed van berberine op signaaltransductiepathway's in macrofagen en epitheelcellen. Pijlen geven activatie weer, loodrechte streepjes inhibitie. Rode pijlen geven de waargenomen effecten van berberine weer. P- geeft fosforylatie weer.

4.1.1.3 Induceerbare genen COX-2 en iNOS

Een ander gevolg van de inhibitie van NF- κ B en AP-1 is een vermindering van de expressie van induceerbare genen zoals COX-2 en iNOS welke eveneens in bovenstaande modellen is aangetoond (Kuo et al., 2004; Lee et al., 2010; Feng et al., 2012; Mo et al., 2014; Zhu et al., 2019a). Ook bij kippen die met LPS gestimuleerd werden, is dit vastgesteld bij berberinebehandeling (Yang et al., 2019). COX-2 is een enzyme dat instaat voor de productie van prostaglandines, thromboxanen en prostacyclines. Deze hebben verschillende effecten op het immuunsysteem waarvan de meeste pro-inflammatoire effecten hebben (Tizard, 2012b).

iNOS is een enzyme dat zorgt voor de productie van stikstofmonoxide, een oxidatieve molecule die op zich zelf niet zo heel toxisch is maar die aanleiding kan geven tot toxischere oxidatieve moleculen zoals een stikstofdioxide radicaal (Tizard, 2012d). Berberine verhindert voor een deel dus de vorming van oxidatieve moleculen en vermindert zo cel- en weefselschade. Dit effect wordt versterkt door de stimulatie van de expressie van antioxidanta via Nrf2 activatie (Mo et al., 2014).

4.1.1.3.1 Macrofagenpopulatie

Al deze effecten hebben ook gevolgen op de macrofagenpopulatie. Er zijn namelijk verschillende types macrofagen die zich onderscheiden in hun functies. M1 type macrofagen komen vnl. voor in het begin van de immuunrespons en produceren vnl. pro-inflammatoire cytokines en NO. Dit resulteert in hoge antimicrobiële activiteit en de daarmee gepaard gaande weefselschade door de inflammatie. Later in de immuunrespons zijn de M2 macrofagen in de meerderheid en zij produceren vnl. anti-inflammatoire cytokines. Zo zorgen zij voor weefselherstel (Tizard, 2012d). Berberine kan de M1 polarisatie verminderen en de ratio M2/M1 verhogen. Hoe dit precies bereikt wordt staat onder discussie. Sommige onderzoeken hebben een verhoging van de M2 populatie vastgesteld waarbij de M1 populatie gelijk blijft. Andere hebben net het omgekeerde vastgesteld, namelijk een verlaging van de M2 populatie en een gelijke M1 populatie (Li et al., 2015; Liu et al., 2018; Lin et al., 2019). Door de M2 polarisatie te stimuleren zal berberine weefselschade beperken. Een nadeel hiervan is dat ook de antimicrobiële functie van het immuunsysteem afgeremd wordt.

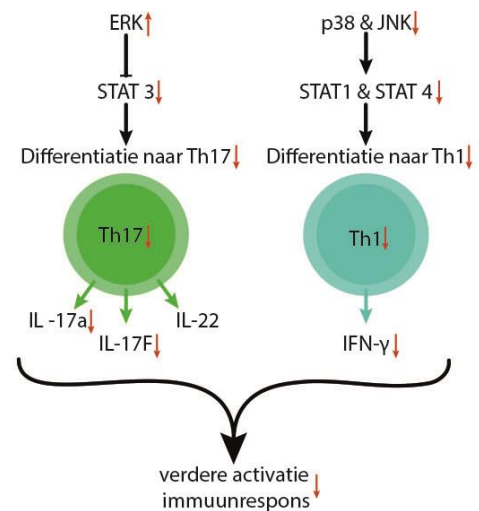
4.1.2 T-helper lymfocyten

Antigeen-presenterende cellen zoals macrofagen en dendritische cellen activeren T-helper cellen en stimuleren hun differentiatie naar Th1, Th2, Th17 of Treg. Deze differentiatie wordt gestuurd door middel van de binding van antigenen aan de T-cel receptor, de aanwezige cytokines en de costimulator moleculen t.h.v. de celmembraan. Th1 en Th17-cellen hebben vnl. een pro-inflammatoire functie en produceren respectievelijk: IFN- γ en IL-17a, IL-17F, IL-22. IFN- γ heeft naast de reeds besproken functies een inhiberend effect op IL-4. IL-17a, IL-17F en IL-22 activeren verschillende cellen van het aangeboren immuunsysteem zoals neutrofielen en macrofagen. Daarenboven stimuleren deze cytokines de productie van pro-inflammatoire cytokines door omliggende immuuncellen. Th2-cellen produceren IL-4, IL-5 en IL-13 welke de B-celproliferatie en de antistofsecretie stimuleren en IFN- γ inhiberen (Tizard, 2012e).

In verschillende stoornissen van het immuunsysteem komt een verhoogd aantal van Th17 en Th1-cellen voor. De effecten van berberine zijn onderzocht bij enkele van deze stoornissen, namelijk ulceratieve colitis, diabetes type 1 bij de mens, encefalomyelitis, en Voght-Koyanagi-Harada. Berberine kan deze verhoging van Th17 verlagen (Cui et al., 2009, 2018; Qin et al., 2010; Yang et al., 2013; Li et al., 2015). Li et al. (2015) hebben eveneens het effect op Th1 onderzocht en deze zijn gereduceerd bij berberinebehandeling. Bij *in vitro* onderzoek kan berberine de differentiatie van Th17 inhiberen. Th1 differentiatie wordt slechts matig geïnhibeerd (Cui et al., 2009; Li et al., 2015). Cui et al. (2018) hebben een verhoging van Treg vastgesteld bij behandeling met berberine in een model van ulceratieve colitis.

De verlaagde Th17 en Th1 populaties gaan in meerdere studies samen met verlaging van cytokineconcentraties die door deze cellen geproduceerd worden, zoals IFN- γ en IL-17 (Cui et al., 2009, 2018; Yang et al., 2013; Li et al., 2015). Er wordt ook een verhoging van IL-10 opgemerkt welke mogelijk is een gevolg is van een verhoging van Treg (Li et al., 2015; Cui et al., 2018). Eveneens is berberine in staat de hoeveelheden immunoglobuline A (IgA) op te drijven (Li et al., 2015; Zhu et al., 2019a). IgA heeft een belangrijke functie in de lokale immuniteit van epitheel en capteren pathogenen micro-organismen nog voor ze het lichaam kunnen binnendringen.

Om het mechanisme hierachter op te klaren is er gekeken naar verschillende transcriptiefactoren met een sleutelrol in de differentiatie van T-helper cellen, namelijk de STAT-familie. Verschillende onderzoekers merken een verhoging van het aantal gefosforyleerde STAT1, gefosforyleerde STAT3 en gefosforyleerde STAT4 op (Cui et al., 2009; Qin et al., 2010; Li et al., 2015). STAT1 en STAT4 vervullen hun rol in de differentiatie naar Th1 en STAT3 speelt een rol in de differentiatie naar Th17 (Amsen et al., 2009; O'Shea et al., 2009; Tizard, 2012e). Cui et al. (2009) hebben via *in vitro* onderzoek kunnen vaststellen dat berberine via activatie van ERK (een MAPK) de fosforylatie van STAT3 inhibeert en zo de Th17-cel differentiatie inhibeert. Ook de Th1-cel differentiatie zou geïnhibeerd worden door een effect van berberine op MAPKs. Hierbij zou berberine p38 MAPK en JNK inhiberen en zo een verlaagde fosforylatie van STAT1 en STAT4 geven (Cui et al., 2009). Deze mechanismen worden weergegeven in figuur 7. De inwerking van berberine op MAPKs vindt ook plaats in het aangeboren immuunsysteem maar daar lijkt berberine geen activerend effect te hebben op ERK maar net een inhiberend (Lee et al., 2010; Yan et al., 2012). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat berberine inwerkt op een andere target of op meerdere targets die de signaalpathway van de MAPKs beïnvloeden.



Figuur 7. Schematische weergave van de waargenomen effecten van berberine op de Th-cel differentiatie. Zwarte pijlen geven activatie weer, het loodrechte streepje inhibitie en de rode pijlen geven de effecten van berberine weer.

Ook co-stimulators die tot expressie worden gebracht in antigeen-presenterende cellen hebben een invloed op de differentiatie. Berberine zou ook een effect hebben op de expressie van deze co-stimulators (Qin et al., 2010; Yang et al., 2013). De werking van berberine zou wel eens complexer kunnen zijn dan de beïnvloeding van de transcriptie via de signaaltransductiemoleculen. Een studie suggereert namelijk dat ook de intestinale microbiota betrokken zouden zijn in het werkingsmechanisme. Wanneer in een diermodel voor ulceratieve colitis deze microbiota vernietigd zijn met verschillende antibiotica kan berberine niet voor een reductie van Th17-cellen zorgen (Cui et al., 2018). Dit zou echter ook kunnen liggen aan de invloed van de microbiota op de farmacokinetiek van berberine en de vorming van bepaalde en potentieel actievere metabolieten.

4.1.3 Anti-inflammatoir effect van de metabolieten

4.1.3.1 Oxyberberine

Zoals eerder besproken werd, is oxyberberine een metaboliet gevormd door de intestinale microbiota. Oxyberberine lijkt gelijkaardige effecten te hebben als berberine maar zou krachtiger zijn dan berberine voor de behandeling van een ulceratief colitis model. Bij toediening van oxyberberine in dit model worden de symptomen (colonverkorting, ziektescore, histologische inflammatie) sterk gereduceerd, sterker dan bij berberine. Net zoals berberine kan oxyberberine zorgen voor een verlaging van pro-inflammatoire cytokines. Deze reductie is merkbaar groter dan de reductie bekomen met eenzelfde dosis berberine. Oxyberberine zorgt eveneens voor een verlaagde hoeveelheid NF-κB en gefosforyleerd IκBα. Ook hier was oxyberberine krachtiger dan berberine (Li et al., 2020). Oxyberberine is dus een veelbelovende metaboliet en verder onderzoek naar deze molecule is dus wenselijk.

4.1.3.2 Fase-I en Fase-II-metaboliëten

Ook jatrorrhizine en palmatine hebben anti-inflammatoire effecten. Jatrorrhizine kan in een marcofagencellijn de expressie van iNOS en COX-2, uitgelokt door LPS, verlagen (Cho, 2011). Palmatine kan in een gelijkaardig *in vitro* onderzoek de expressie van pro-inflammatoire cytokines verlagen alsook de NO-productie. Er wordt hierbij eveneens een verhoging van IL-10 vastgesteld (Yan et al., 2017). Berberrubine heeft een gelijkaardig effect aan berberine in een ulceratief colitis model en zorgt voor een reductie van pro-inflammatoire cytokines (Yu et al., 2018).

4.2 Antibacterieel effect

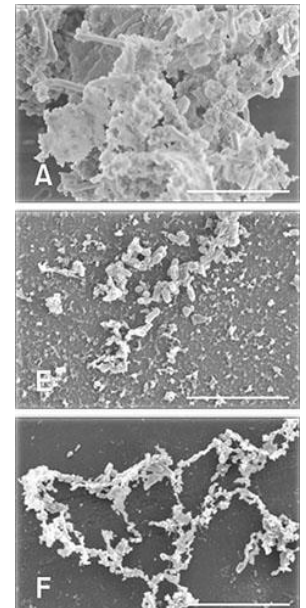
4.2.1 Spectrum

Er is reeds een antibacterieel effect aangetoond van berberine tegen zowel grampositieve als gramnegatieve kiemen. Dit is vastgesteld via verschillende methodes: microdilutie, agar disk diffusie en time-kill curves. Via een microdilutiemethode kan de minimale inhibitorische concentratie bepaald worden. Er is echter een grote variatie in de vastgestelde MICs tussen stammen van eenzelfde species. Zo zijn er bijvoorbeeld voor *Salmonella* Typhimurium verschillende MICs van 76 µg/mL tot 2048 µg/mL vastgesteld (Kim et al., 2004; Jin et al., 2010; Liu et al., 2015; Aswathanarayan en Vittal, 2018). Ook bij de agar disk diffusie methode is er veel variatie in de bekomen resultaten (Freile et al., 2003; Malik et al., 2017). Stamverschillen en de aanwezigheid van resistentiemechanismen dragen hier toe bij (Balouiri et al., 2016). Deze resultaten dienen dus voorzichtig geïnterpreteerd te worden. Op die manier zou berberine potentieel een bacteriostatisch effect kunnen hebben op *Staphylococcus aureus* inclusief methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, niet-coagulase producerende *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus Subtilis*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, *Pasteurella multocida*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* en *Helicobacter pylori* (Mahady et al., 2003; Kim et al., 2004; Ball et al., 2006; Oh et al., 2006; Wojtyczka et al., 2014; Kang et al., 2015; Peng et al., 2015; Chu et al., 2016; Feng et al., 2016; Malik et al., 2017; Aswathanarayan en Vittal, 2018). De MIC ligt hierbij vaak hoger dan 100 µg/mL en dus veel hoger dan de klassieke antibiotica. Palmatine, een metaboliëten van berberine, heeft op eenzelfde manier een potentieel antibacterieel effect op *Staphylococcus aureus* en *Bacillus subtilis* (Kim et al., 2004).

Op basis van de grote variatie in de voorgaande methodes is het moeilijk om een conclusie te trekken omtrent het antibacterieel effect. Time-kill testen vormen een betere methode om dit effect vast te stellen waarbij ook tijdsafhankelijkheid bepaald kan worden (Balouiri et al., 2016). Deze tonen een goede werking van berberine tegen *A. pleuropneumonia*, *P. multocida*, *S. agalactiae*, en niet-coagulase producerende *Staphylococcus spp.* (Wojtyczka et al., 2014; Kang et al., 2015; Peng et al., 2015; Feng et al., 2016). Bij *A. pleuropneumonia*, *P. multocida* en *S. agalactiae* wordt zowel een tijds- als concentratieafhankelijk effect waargenomen (Kang et al., 2015; Peng et al., 2015; Feng et al., 2016). Bij *S. agalactiae* kon berberine aan een concentratie van 78 µg/mL alle kiemen afdoden na 8 uur (Peng et al., 2015).

In het reeds vermeld onderzoek is meestal gebruik gemaakt van standaardstammen. Echter zijn de stammen aanwezig in dieren continu onderhevig aan evolutie. Ook is niet elke stam even pathogeen en in staat om ziekte te veroorzaken. Het is dan ook relevanter om de gevoeligheid van stammen geïsoleerd uit klinisch zieke dieren te onderzoeken. Zo is de gevoeligheid onderzocht van multiresistente ETEC en STEC/EPEC geïsoleerd uit jaks, een aziatische rundersoort, met hemorragische diarree. Deze stammen zijn gevoelig aan 3 µg/mg berberine in een agar disk diffusie test. Ook bij de microdilutie methode zijn deze kiemen gevoelig aan berberine en de MIC₅₀ bedraagt 2,07 µM - 3,6µM (0,70 µg/mL – 1,2 µg/mL) voor STEC/EPEC en 1,75 µM - 1,96 µM (0,59 µg/mL - 0,66 µg/mL) voor ETEC (Bandyopadhyay et al., 2013).

Naast de directe antibacteriële effecten kan berberine ook verschillende eigenschappen van bacteriën beïnvloeden zoals biofilmvorming en virulentie (Aswathanarayan en Vittal, 2018). Berberine heeft een inhibitorisch effect op de biofilmformatie van *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, MRSA, *S. epidermidis* en *E. coli* (Wang et al., 2009; Chu et al., 2016; Chen et al., 2016a; Aswathanarayan en Vittal, 2018; Shi et al., 2018; Sun et al., 2019). Het effect op een biofilm van *Salmonella* spp. is zichtbaar in figuur 8. Berberine zou ook de virulentie kunnen verminderen van *Salmonella* Typhimurium. Er wordt namelijk een reductie waargenomen van de adhesie en de invasie van de kiemen aan/van een coloncellijn. Er wordt eveneens een reductie waargenomen van het aantal geparalyseerde *C. elegans* wormen geïnfecteerd met *Salmonella* Typhimurium. *C. elegans* wormen worden gebruikt als model om de pathogeniciteit van bacteriën te bestuderen (Aswathanarayan en Vittal, 2018).



Figuur 8. Effect van berberine op biofilmvorming van een multiresistente *Salmonella* stam, waargenomen via scanning electron microscopy. A: onbehandeld, E: ½ MIC van berberine F: ¼ MIC van berberine (Naar: Shi et al., 2018).

Tot slot is er ook een synergistisch effect vastgesteld tussen berberine en enkele antibiotica. Zhou et al. (2015) onderzochten de gevoeligheid van *Staphylococcus epidermidis* stammen geïsoleerd uit koeien met klinische mastitis. Bij deze resistente en multiresistente stammen werd een synergistisch effect waargenomen van berberine met penicilline, lincomycine en amoxicilline. De combinatie van berberine met deze antibiotica kon hun MICs tot 16 maal verlagen. (Zhou et al., 2015).

4.2.2 Mechanisme

Berberine werkt in op meerdere targets in bacteriën. Bij een concentratie hoger dan de MIC werkt berberine via verschillende mechanismen waardoor groei verhinderd wordt (Boberek et al., 2010; Karaosmanoglu et al., 2014). Bij een concentratie lager dan de MIC kan berberine virulentiefactoren beïnvloeden en zo de pathogeniciteit van de bacterie verlagen (Aswathanarayan en Vittal, 2018).

4.2.2.1 Directe antibacteriële mechanismen

Berberine werkt in op verschillende bacteriële targets die cruciaal zijn voor hun groei en hun vitaliteit. Het interfereert met de celsplitsing in bijzonder via het FtsZ eiwit (Boberek et al., 2010). Bij celdeling vormen FtsZ eiwitten samen met andere eiwitten een ring t.h.v. de toekomstige splitsingsplaats welke later contraheert. Berberine bindt dit eiwit *in vitro* met hoge affiniteit en inhibeert de FtsZ assemblage tot een ring (Domadia et al., 2008). De cruciale rol van dit eiwit in het werkingsmechanisme van berberine kan ook *in vivo* bevestigd worden (Boberek et al., 2010).

Daarnaast is er een hoge bindingsaffiniteit van berberine aan DNA t.g.v. zijn planaire structuur (Jin et al., 2010; Bandyopadhyay et al., 2013; Karaosmanoglu et al., 2014). Berberine heeft vnl. een hoge affiniteit voor AT-rijke sequenties (Karaosmanoglu et al., 2014). Bij incubatie van *E. coli* met berberine kan een verhoging van de expressie van genen geassocieerd met DNA-herstel worden waargenomen. DNA-binding zorgt voor beïnvloeding van de duplicatie en transcriptie en zorgt mogelijk ook voor DNA-schade. Toch wordt aangenomen dat dit niet het primaire mechanisme van berberine is doordat er ook een opregulatie van genen met AT-rijke initiatieplaatsen wordt waargenomen (Karaosmanoglu et al., 2014). Dit kan ook gestaafd worden via het ontbreken van de initiatie van de SOS-respons in een *E. coli* blootgesteld aan berberine. De SOS respons is een herstelmechanisme dat DNA-schade detecteert en herstel ervan activeert (Boberek et al., 2010).

Tot slot zou de activiteit van bepaalde enzymen beïnvloed kunnen worden door berberine. Deze heeft namelijk een dosisafhankelijk inhiberend effect op de N-acetyltransferase (NAT) activiteit van *Salmonella* Typhi. De kinetiek hiervan komt overeen met een niet-competitieve inhibitor (Wu et al., 2005). Een niet-competitieve inhibitor bindt enkel aan het complex van het enzym en zijn substraat en verhindert vervolgens de omzetting van dit substraat (Strelow et al., 2004).

4.2.2.2 Anti-infectie mechanisme

Naast voorgaande effecten welke zorgen voor de verminderde groei en een reductie van vitaliteit van bacteriën, kan berberine ook de virulentie en de biofilmformatie van bacteriën beïnvloeden. Deze effecten doen zich voor bij sub-inhibitorische concentraties (< MIC). Een voorbeeld hiervan is de inwerking van berberine op sortase A bij grampositieve bacteriën (Oh et al., 2006; Chen et al., 2016a). Sortase A is een membraangebonden transpeptidase met een rol in de adhesie aan fibronectine en fibrinogeen van de gastheer. Berberine en ook palmatine kunnen dit enzyme inhiberen (Kim et al., 2004; Oh et al., 2006). Berberine kan eveneens de adhesie van *Staphylococcus spp.* aan fibronectine reduceren (Oh et al., 2006). Ook sortase B, een enzym dat een rol speelt in het verwerven van ijzer tijdens een infectie, wordt gehinibeerd door berberine (Mazmanian et al., 2003; Oh et al., 2006). Bij uropathogene *E. coli* zorgt berberine ervoor dat de expressie van Pap fimbriae sterk verlaagd is (Sun et al., 1988). Deze fimbriae zijn zeer belangrijk bij de adhesie van deze bacterie aan epitheelcellen. Dit type van fimbriae wordt vnl. geassocieerd met uropathogene *E. coli* stammen (De Ree et al., 1987).

Ook de vorming van biofilm wordt verstoord door berberine. Extracellular polymeric substance (EPS) is een substraat dat in biofilms gevormd wordt en zorgt voor adhesie van de biofilm aan een oppervlak alsook voor de integriteit van de biofilm. EPS wordt ook gereguleerd door het quorum sensing mechanisme. Dit mechanisme zorgt voor genexpressieregulatie als gevolg van bacteriedensiteit en is dus een cruciaal mechanisme in de biofilm vorming. Aswathanarayan en Vittal (2018) suggereren dat berberine dit mechanisme inhibeert en zo de EPS-productie verlaagt. Dit kan bevestigd worden doordat de expressie van genen geassocieerd met het quorum sensing mechanisme gereduceerd is in een resistente *E. coli* stam blootgesteld aan berberine (Sun et al., 2019). Ook bij een multiresistente *Salmonella* stam geïsoleerd uit kippen is dit waargenomen. Dit gaat samen met een verlaging van genen geassocieerd met verschillende virulentiefactoren zoals pili, curli en flagelline (Shi et al., 2018). Phenol-soluble modulines (PSM) organiseren zich tot amyloïde fibrillen om de biofilm van MRSA te vormen. Berberine is ook in staat om deze organisatie van PSM tot amyloïde fibrillen te verstoren (Chu et al., 2016). Ten gevolge van deze eigenschap suggereren Chu et al. (2016) dat berberine ook de vorming van andere bacteriële amyloïde fibrillen kan verstoren zoals curli bij *E. Coli*.

Een biofilm beschermt de bacteriën tegen antibiotica door ze te beschermen met een extracellulaire matrix. Door de vorming van een biofilm te inhiberen zou berberine bij een gelijktijdige toediening met antibiotica er mogelijks voor kunnen zorgen dat de bacteriën beter bereikbaar zijn voor de antibiotica. Zo kan de bacteriële resistentie door biofilmvorming gereduceerd worden. Daarnaast heeft berberine ook een negatieve invloed op de virulentie van bacteriën en kan het ervoor zorgen dat er minder kans is op infectie. Aangezien bij deze lage concentratie geen effect is op de leefbaarheid is er minder kans op het ontwikkelen van selectie-gedreven resistentie. Berberine aan sub-inhibitorische concentratie zou dus potentieel als anti-infectie middel kunnen worden ingezet.

4.2.2.3 Mechanisme van bacteriële resistentie tegen berberine

De verschillende gevoeligheid van de verschillende stammen kan deels toegewezen worden aan resistentie. Berberine is een substraat van NorA, een multidrug efflux pomp (MDR), welke bepaalde substraten terug uit de bacterie pompt (Hsieh et al., 1998). In sommige planten zoals *H. canadensis* zitten inhibitoren van NorA. Deze kunnen bij gelijktijdige toediening met berberine de werking van berberine sterk verbeteren (Ettfagh et al., 2011). Bij synthese van een hybridemolecule samengesteld uit berberine en een NorA inhibitor is een 100x hogere gevoeligheid verkregen van een *Staphylococcus aureus* stam (Ball et al., 2006). Hiernaast wordt ook een verlaagde membraanpermeabiliteit voor berberine waargenomen in een *E. coli* stam (Karaosmanoglu et al., 2014). Mogelijks hebben ook nitroreductase enzymen een rol in de resistentie. Deze zetten berberine om in dihydroberberine die mogelijks geen antibacteriële activiteit heeft. Dit is nog niet onderzocht.

4.3 Antiprotozoair effect

Berberine heeft *in vitro* een negatief effect op de groei van *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, en *Giardia lamblia* (Kaneda et al., 1991).

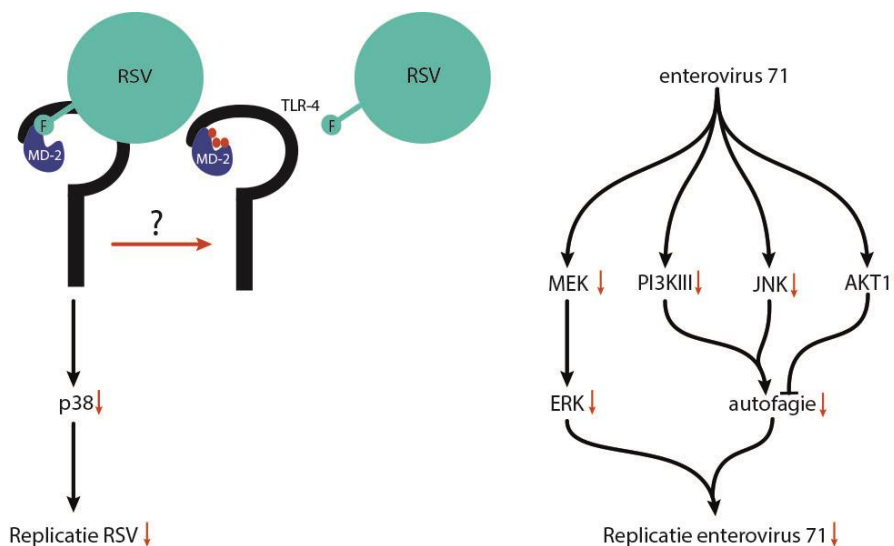
Het effect van berberine tegen coccidia is in kaart gebracht door middel van *in vivo* onderzoek bij muizen en kippen. Het aantal oöcyten per gram feces (OPG) 5 dagen na infectie met *Eimeria papillata* bij de muis en met *Eimeria tenella* bij de kip kan verlaagd worden door een berberine behandeling. Het effect van een berberine behandeling op coccidiose is vergeleken met een amprolium behandeling. Amprolium is een coccidiostatisch diergeneesmiddel geregistreerd voor kippen en inhibeert de opname van thiamine in de 2^{de} generatie van schizonten (een stadium in de vermenigvuldiging van de parasiet) (James, 1980). Een dosis berberine van 100 mg/kg lichaamsgewicht (LG) gedurende 5 dagen kan de OPG reduceren tot minder dan 1 % van de OPG bij start van de behandeling. Deze reductie is vergelijkbaar met deze van eenzelfde dosis aan amprolium. Bovendien lijkt een 1:1 combinatie van berberine en amprolium een synergistisch effect te hebben op de OPG (Malik et al., 2016).

Het mechanisme achter deze effecten is nog niet bekend. Er zijn echter wel hypothesen. Zo zouden de anti-inflammatoire effecten, de invloed op de intestinale microbiota en de invloed op de darmbarrière (zie later) het milieu van het darmepitheel wijzigen. Als gevolg zou de vermenigvuldiging en de ontwikkeling van de verschillende stadia in deze epitheelcellen mogelijks verstoord kunnen worden. Bij muizen geïnfecteerd met *E. papillata* kan een gelijkaardig effect worden waargenomen op de cytokines en de antioxidanta als eerder besproken bij de anti-inflammatoire effecten (Dkhil et al., 2015). Bij kippen geïnfecteerd met *E. tenella* is er bij een berberine behandeling een verlaging van oxidatieve stress en een verhoging van antioxidanta waargenomen (Zhu et al., 2019b). Toch zou berberine ook een direct effect kunnen hebben op coccidia (Dkhil et al., 2015).

4.4 Antiviraal effect

Een antivirale activiteit van berberine is via *in vitro* onderzoek in verschillende cellijnen aangetoond bij H1N1 influenza virus, respiratoir syncytieel virus (RSV), enterovirus 71 en hepatitis C virus (Cecil et al., 2011; Shin et al., 2015; Wang et al., 2017a; Yan et al., 2018; Hung et al., 2019). Ook *in vivo* is er een antivirale activiteit van berberine vastgesteld tegen H1N1 in muizen. Hierbij wordt een verlaagde virustiter en een verlaagde expressie van viraal eiwit waargenomen in de longen. Ook de schade van longen is significant minder bij muizen die 7 dagen behandeld werden met 20 mg/kg LG berberine (Yan et al., 2018). Coptidis rhizoma, een plantendeel rijk aan berberine, heeft *in vitro* een antiviraal effect bij het mouse hepatitis virus A59 (MHV-A59) en het porcien epidemisch diarree virus (PEDV) (Kim et al., 2008). Beide zijn coronavirussen.

De invloed van berberine is door Hung et al. (2019) gelokaliseerd t.h.v. de adhesie en de fusie van het virus met een gastheercel. Cecil et al. (2011) tonen daarentegen een effect aan op de translocatie van viraal eiwit na de productie in de gastheercel. Bij geïnfecteerde cellen met coronavirussen blootgesteld aan *Coptidis rhizoma* wordt de werking gelokaliseerd t.h.v. de RNA-replicatie en mogelijks ook de assemblage en de vrijstelling van het virus (Kim et al., 2008). Verschillende *in vitro* onderzoeken tonen een effect aan van berberine op de MAPKs in cellen geïnfecteerd met RSV en enterovirus 71 (Shin et al., 2015; Wang et al., 2017a). In Vero cellen geïnfecteerd met enterovirus 71 kan berberine enerzijds de MEK/ ERK pathway inhiberen en anderzijds autofagie inhiberen via inhibitie van PI3III en activatie van AKT 1. Zowel autofagie als de MEK/ ERK pathway spelen een cruciale rol in de replicatie van dit virus (Wang et al., 2017a). Bij A549 cellen geïnfecteerd met RSV, inhibeert berberine p38 MAPK (Shin et al., 2015). Voor H1N1 influenza en RSV is de activatie van p38 MAPK essentieel voor de virale replicatie en een succesvolle infectie. Bovendien is ook aangetoond dat TLR4 naast herkenning van LPS ook virale glycoproteïnen van deze virussen kan herkennen. De herkenning van deze bestanddelen door TLR4 activeert vervolgens p38 MAPK op gelijkaardige wijze als eerder besproken bij LPS (Marchant et al., 2010). Inhibitie van p38 MAPK en TLR4 kan dus een mogelijk mechanisme zijn in de antivirale effecten tegen RSV en in H1N1. Daarenboven is ook aangetoond dat voor RSV, de interactie van het viraal fusie proteïne met MD-2 cruciaal is voor de activatie van TLR4 en p38 MAPK (Rallabhandi et al., 2012). Aangezien berberine de binding van LPS aan MD-2 verhindert, zou berberine dus ook potentieel deze interactie kunnen verhinderen (Chu et al., 2014). De verschillende mechanismen i.v.m. antivirale effecten worden schematisch voorgesteld in figuur 9.



Figuur 9. Schematische weergave van de waargenomen antivirale mechanismen van berberine. Zwarte pijlen stellen activatie voor, loodrecht lijntje stelt inhibitie voor en F staat voor fusie proteïne. Rode pijlen geven de effecten van berberine weer. De interactie van RSV met MD-2 en TLR4 wordt schematisch voorgesteld en is geen realistische weergave van de interactie.

4.5 Effecten ter hoogte van de darm

4.5.1 Integriteit van de darmbarrière

De darmbarrière heeft een cruciale rol in de bescherming tegen translocatie van pathogenen vanuit het darmlumen en speelt een belangrijke rol in de water- en ionenhuishouding. Pathogenen en pro-inflammatoire cytokines kunnen deze barrièrefunctie verstoren, enerzijds door destructie van het epitheel zelf en anderzijds door de beïnvloeding van de tight junctions, welke het paracellulaire transport regelen. Berberine is in staat deze verstoring deels te verhinderen.

Zowel *in vivo* als *in vitro* wordt een verhoogde transepitheliale weerstand waargenomen als gevolg van berberine behandeling van epitheel blootgesteld aan pro-inflammatoire cytokines of LPS (Cao et al., 2013; DiGuilio et al., 2016; He et al., 2018b, 2019). Opmerkelijk wordt ook een verhoging van transepitheliale weerstand waargenomen zonder blootstelling van de epitheellaag aan cytokines of LPS (Cao et al., 2013; DiGuilio et al., 2016). De flux van fluoresceïne isothiocyanaat dextraan (FITC-dextraan) is een maat voor de permeabiliteit van het darmepitheel. Deze is zowel *in vitro* als *in vivo* verlaagd bij berberine behandeling van verschillende ontstekingsmodellen (Gu et al., 2011; Cao et al., 2013; Li et al., 2014; He et al., 2018b, 2019). Zo is een significante verlaging waargenomen van FITC-dextraan, 12 uur na LPS toediening welke voorafgegaan werd door een toediening van berberine (Gu et al., 2011).

Berberine behandeling zorgt voor een verbetering van de verstoorde organisatie en morfologie van de tight junctions (Gu et al., 2011; Cao et al., 2013). Tight junctions worden gevormd door verschillende transmembranaire proteïnen zoals occludine, claudine en JAM-A. Deze proteïnen van 2 naburige cellen interageren met elkaar in de paracellulaire ruimte en beperken zo het paracellulaire transport. Zonula occludens (ZO) eiwitten verankeren de transmembranaire proteïnen aan het cytoskelet welke o.a. gevormd is uit F-actine (Zeisel et al., 2019). Berberine kan geassocieerd worden met een verhoging van de expressie van occludine, claudine (1,4 en 12), JAM-A, ZO-1 en F-actine (Li et al., 2014, 2020; He et al., 2018b, 2019; Hou et al., 2019). Ook berberrubine en oxyberberine hebben een gelijkaardig effect op ZO-1, occludine, claudine-1 en zijn krachtiger dan berberine (Yu et al., 2018; Li et al., 2020).

Boven de epitheliale cellen van darm ligt een laagje mucus die bijdraagt tot de barrièrefunctie. Deze bestaat uit mucines welke geproduceerd worden door slijmbekercellen. Deze zijn o.a. verlaagd in aantal bij ulceratieve colitis modellen. Berberine behandeling kan de mRNA expressie van mucine 1 en 2 verhogen in dat model. Deze verhoging is ook beschreven voor berberrubine en oxyberberine en deze metabolieten zijn krachtiger (Yu et al., 2018; Li et al., 2020).

Stimulatie van de MLCK expressie en stimulatie van de IGF-1 lijken de belangrijkste pijlers van het mechanisme achter de darmbarrière verbetering. In figuur 10 worden de beschreven mechanismen schematisch weergegeven. De organisatie en verspreiding van de tight junction proteïnen wordt o.a. geregeld via de fosforylatie van myosin light chain (MLC) waarbij een verhoging van deze fosforylatie leidt tot een meer permeabele tight junction. Deze fosforylatie wordt gekatalyseerd door MLC-kinase (MLCK) (Cunningham en Turner, 2012). De expressie van dit enzym wordt verhoogd door stimulatie van transcriptiefactoren NF- κ B en HIF-1 α (Qi et al., 2011; Cunningham en Turner, 2012). Berberine is in staat een verhoging van de expressie van MLCK om te keren. Hierbij wordt eveneens een inhibitie van transcriptiefactoren waargenomen (Gu et al., 2011; Cao et al., 2013; Hou et al., 2019). De inhibitie van NF- κ B door berberine kan in verband gebracht worden met een verlaging van TRAF6 eiwitexpressie. TRAF6 speelt een cruciale rol in de activatie van IKK. Verder wordt eveneens een verhoging van A20 expressie vastgesteld welke een inhiberend effect heeft op TRAF6 (Hou et al., 2019).

IGF-1 expressie in de darm, welke eveneens geassocieerd is met een goede barrièrefunctie, is verhoogd na berberine behandeling. De verhoging van de expressie van tight junction eiwitten t.g.v. berberine wordt deels geassocieerd met de verhoging van IGF-1 expressie (He et al., 2018a). IGF-1 zorgt ook voor een verlaging van de ratio van BAX/Bcl-2 en een verlaging van apoptose (Zhao et al., 2015). Mogelijks draagt de IGF-1 verhoging dan ook bij tot de verlaagde apoptose en de verlaagde BAX/Bcl-2 ratio die wordt waargenomen bij een berberine behandeling van ulceratieve colitis. Deze verlaging van BAX/Bcl-2 ratio wordt eveneens waargenomen bij berberrubine behandeling (Yu et al., 2018). Berberine heeft in een polymicrobieel sepsis model eveneens een positief effect op het zinkgehalte in de darm. Redistributie van zink tijdens sepsis kan lijden tot een verminderde functie van de darmbarrière (Zhong et al., 2010).

Deze verhoging wordt geassocieerd met de waargenomen verhoogde expressie van ZIP14, een eiwit met een belangrijke rol in de regeling van de zinkhomeostase in de darm. Deze invloed op ZIP14 zou mogelijks ook een gevolg kunnen zijn van de opregulatie van IGF-1 (He et al., 2019).

4.5.2 Effect op motiliteit en viscerale pijn van de darm

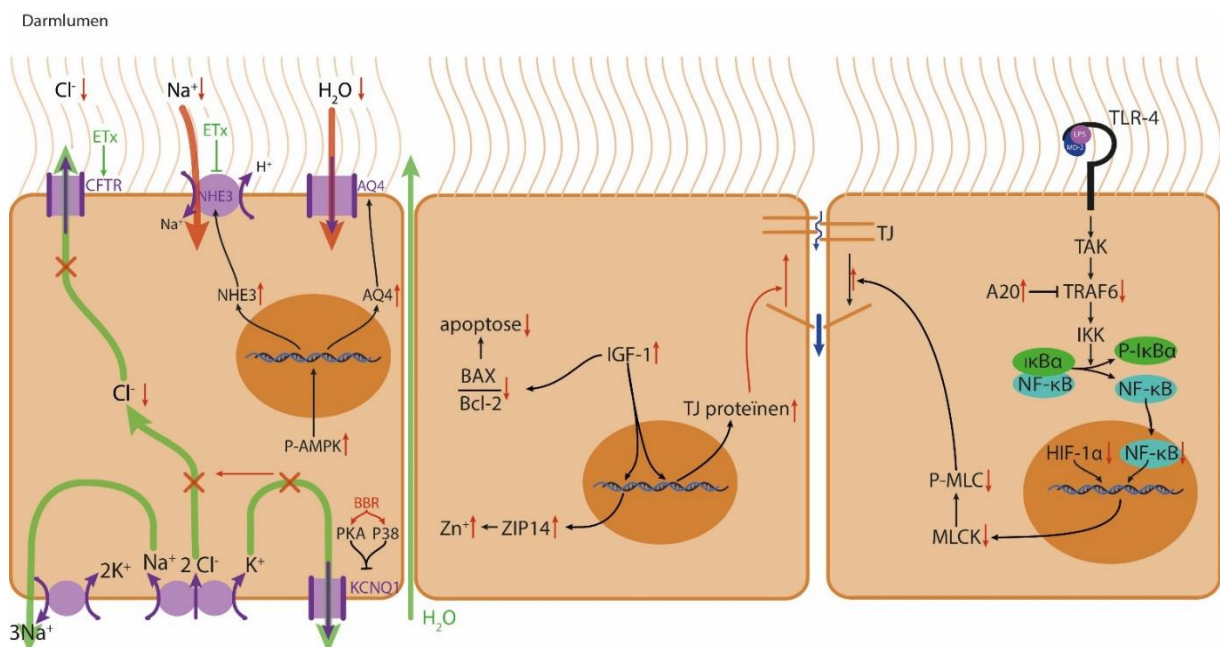
De motiliteit van het spijsverteringstelsel heeft een grote invloed op de transitijd. Er wordt een verminderde motiliteit en een verhoogde transitijd vastgesteld bij berberine behandeling van wonderolie geïnduceerde diarree bij muizen (Chen et al., 2015a). Ook in gezonde knaagdieren wordt dit waargenomen (Feng et al., 2013). Chen et al. (2013a) hebben echter een bidirectioneel effect van berberine op de contractiliteit vastgesteld. Bij een reeds verhoogde jejunale contractiliteit heeft berberine een inhibitorisch effect en bij een reeds verlaagde jejunale contractiliteit een stimulerend effect. Het effect van berberine op een normaal contractiel jejunum is afhankelijk van de concentratie van berberine (Chen et al., 2013a). Berberine heeft eveneens een bidirectioneel effect op de MLCK expressie en de MLC fosforylatie in enerzijds een geconstipeerd rattenmodel en anderzijds een diarree rattenmodel. Fosforylatie van MLC heeft naast een rol in de darmbarrière een cruciale rol in de spiercontractie waarbij het de motor vormt van de contractie. Hiernaast kan het toedienen van berberine bij chemisch geïnduceerde viscerale pijn bij muizen, het pijn gerelateerd gedrag van deze dieren verminderen (Chen et al., 2015a).

De effecten op darmmotiliteit zouden het gevolg zijn van een beïnvloeding van de calciuminflux en een beïnvloeding van het enterisch zenuwstelsel (Chen et al., 2013a). Verschillende receptoren voor neurotransmitters die gevormd worden door de neuronen van het enterisch zenuwstelsel zouden beïnvloed worden door berberine (Chen et al., 2013a; Feng et al., 2013; Chen et al., 2015a). Het inhibitorische effect van berberine op de darmcontractiliteit wordt geassocieerd met een activatie van α -adrenerge en β -adrenerge receptoren. Het stimulerend effect ervan op de contractiliteit wordt geassocieerd met de activatie van een muscarine receptor. Ook de activatie van NO-synthase zou betrokken zijn in het mechanisme van inhibitie (Chen et al., 2013a). Ook de opioïde receptoren zijn vermoedelijk betrokken bij het effect op de motiliteit. Er is echter wel discussie over welke types betrokken zijn. Zowel Chen et al. (2015a) als Feng et al. (2013) stelden een betrokkenheid vast van de μ receptor. Chen et al. (2015a) toonden eveneens een betrokkenheid van de δ -receptor aan en Feng et al. (2013) van de κ receptor. De activatie van opioïde receptoren zorgt zowel voor een verlaagde darmmotiliteit als voor een reductie van viscerale pijn. Naast het enterisch zenuwstelsel hebben ook de interstitiële cellen van Cajal een rol in de gastrointestinale motiliteit. Hun pacemaker potentialen beïnvloeden gladde spiercellen en enterische neuronen (Takaki, 2003). Berberine inhibeert de pacemaker potentialen zowel in frequentie als amplitude. De inhibitie van de motiliteit zou het gevolg zijn van de activatie van μ en δ opioïde receptoren. Deze activatie zorgt voor een stijging van cGMP en vervolgens de activatie van PKG. Deze zou dan de ATP-gevoelige K^+ -kanalen activeren en zo het membraanpotential negatief beïnvloeden door K^+ -efflux (Kim et al., 2016).

4.5.3 Effect op de secretie in de darm

Verschillende bacteriële toxines kunnen waterige diarree veroorzaken door het beïnvloeden van het ionentransport t.h.v. de mucosa. De verhoogde concentratie van ionen in de darm trekt dan H_2O aan via osmose zodat diarree ontstaat. Bekende voorbeelden hiervan zijn ST- en LT-toxines geproduceerd door ETEC en CT geproduceerd door *Vibrio cholerae*. In een darmlusmodel van ST- en LT-blootgestelde konijnen en muizen wordt de secretie gereduceerd door toediening van berberine (Sack en Froehlich, 1982). Ook de secretie geïnduceerd door CT is gereduceerd door berberine in eenzelfde model bij de rat (Swabb et al., 1981).

ETEC enterotoxines stimuleren een apicaal secretoir Cl⁻-kanaal, namelijk CFTR (Lima en Fonteles, 2014). Deze Cl⁻-uitstroom vereist echter een hogere Cl⁻ in de cel dan in het darmlumen. Om de Cl⁻-concentratie in de cel voldoende hoog te houden dient Cl⁻ in de cel gepompt te worden. Dit gebeurt via een Na⁺-K⁺-Cl⁻-cotransporter welke op zijn beurt een lage concentratie van Na⁺ en K⁺ in de cel vereist. De Na⁺ wordt weg gepompt via de Na⁺-K⁺ ATPase en K⁺-uitstroom vindt plaats via o.a. KCNQ1 K⁺-kanalen (Schultheiss en Diener, 1998; Alzamora et al., 2011). Alzamora et al. (2011) toonden aan dat berberine via de activatie van p38 MAPK en PKA, KCNQ1 fosforyleerde en zo dit kanaal inhibeerde. Op die manier verkleint de K⁺-gradiënt. Deze K⁺-gradiënt is op zijn beurt vereist voor de werking van de cotransporter met Cl⁻. Als gevolg hiervan zal ook de Cl⁻ gradiënt verkleinen. Hiernaast inhiberen enterotoxines NHE3, een apicale Na⁺-H⁺-cotransporter welke Na⁺ in de cel pompt en H⁺ uit de cel (Lima en Fonteles, 2014). Tevens inhiberen enterotoxines de aquaporine 4 (AQP4) expressie (Zhang et al., 2018). Deze aquaporines zorgen voor de absorptie van H₂O vnl. in het colon. Bij toediening van berberine wordt een verhoging van expressie van zowel AQP4 en NHE3 vastgesteld. Deze verhoging kon geassocieerd worden met een AMPK fosforylatie (Zhang et al., 2012). Een inwerking van berberine op AMPK werd reeds aangehaald in het mechanisme van het anti-inflammatoire effect van berberine.



Figuur 10. Schematische weergave van de beschreven mechanismen van de effecten van berberine (BBR) op de ionen- en watersecretie en de darmbarrière. Onder andere de beïnvloeding van de tight junctions (TJ) wordt weergegeven. Pijlen geven activatie weer, loodrechte streepjes inhibitie. Groene pijlen/streepjes geven de effecten van enterotoxines (ETx) op de secretie weer. Rode pijlen/kruisen stellen de effecten van berberine voor.

4.5.4 Effect op de intestinale microbiota

Hoewel er op meerdere plaatsen in het spijsverteringsstelsel een microbiom aanwezig is, is voornamelijk dat van het distale ileum en het colon onderzocht met betrekking tot de effecten van berberine. Het intestinale microbiom bestaat uit talrijke bacteriën, archaea, protozoa en fungi welke de darmwand koloniseren. Deze kolonisatie vormt een extra barrière tegen de translocatie van pathogene bacteriën van het darmlumen naar de bloedbaan o.a. door competitie. Hiernaast produceren deze micro-organismen verschillende metabolieten welke het metabolisme, de immuniteit en de integriteit van darmwand van de gastheer kunnen beïnvloeden. Hun metabolieten hebben ook een rol in de voeding van de gastheer. De talrijke effecten van berberine zouden dus mogelijks ook veroorzaakt worden door modulatie van het intestinale microbiom.

Toediening van berberine verhoogt het aantal korte-keten vetzuur- (SCFA) producerende bacteriën in verschillende ziektemodellen met een verstoord microbiom. Er zijn dan ook verhoogde fecale SCFA-concentraties waargenomen in deze modellen. (Wang et al., 2017d; Zhang et al., 2019a; Chen et al., 2020). Dit wordt bijvoorbeeld waargenomen bij ratten met een geïnduceerde intestinale mucositis t.g.v. een chemotherapeuticum, die behandeld worden met berberine. Hierbij wordt een stijging van fecale butyraat waargenomen. Ook een stijging van fecaal glutamine, een aminozuur, wordt waargenomen. Transplantatie van de feces van deze dieren naar dieren met dezelfde aandoening maar zonder berberine behandeling levert een verminderde inflammatie en een verbeterde barrièrefunctie van de darm op. Dit wijst erop dat de anti-inflammatoire effecten en de effecten van berberine op de darmwand deels het gevolg zijn van modulatie van het microbiom (Chen et al., 2020). Wang et al. (2017d) stelden eveneens een stijging van butyraat vast bij verschillende diermodellen voor obesitas geassocieerde metabole ziektes. Deze stijging was deels verantwoordelijk voor de metabole effecten van berberine (Wang et al., 2017d). In db/db muizen, een model voor obesitas geassocieerde metabole ziektes is een toename waargenomen van acetaat (Zhang et al., 2019a). Hiernaast is ook een stijging waargenomen in het voorkomen van *Akkermansia*, bacteriën die in staat zijn de inflammatie te verminderen (Dao et al., 2016; Zhang et al., 2019a). Cui et al. (2018) toonden in een ulceratief colitis model aan dat intestinale microbiota nodig waren voor het effect van berberine op de Th17 differentiatie. In dit model wordt een stijging van *Eubacterium* vastgesteld t.g.v. berberine toediening (Cui et al., 2018). Deze bacteriën zijn in staat butyraat te produceren (Kanauchi et al., 2006). Ook bij gezonde beagles kan berberine na herhaalde toediening gedurende 7 dagen het aantal butyraat producerende bacteriën verhogen alsook de concentratie van butyraat in feces en plasma (Feng et al., 2018).

SCFA zouden een immunomodulerend effect hebben door beïnvloeding van de NF- κ B en de MAPK pathways. Deze modulatie wordt geassocieerd met de inwerking van SCFA op FFA-receptoren en op histone deacetylases (HDAC) (Li et al., 2018). Liu et al. (2019a) onderzochten de effectiviteit van Gegen Ginlian Decotion, een mengeling uit de traditionele Chinese geneeskunde waarvan berberine een van de hoofdcomponenten is, op *E. coli* diarree bij biggen. Hierbij is een verhoging waargenomen van SCFA producerende bacteriën, een verhoging van fecale acetaat, propionaat en butyraat en een verlaagde HDAC1 expressie (Liu et al., 2019a). Verder beïnvloeden SCFA ook de darmbarrière. Butyraat induceert de expressie van verschillende tight junction proteïnes (Venegas et al., 2019). Glutamine heeft een inhiberend effect op NF- κ B pathway en zorgt voor een verbetering van de darmbarrière (Kim en Kim, 2017)

Dysbiose van het microbiom kan bijdragen tot inflammatie en verstoring van de darmbarrière. Bij gelijktijdige toediening van berberine en vancomycine wordt de dysbiose die geassocieerd wordt met vancomycine verholpen. Berberinetoediening inhibeert hierbij de overgroei van *Proteobacteria* (Lv et al., 2015). Zowel berberine als oxyberberine zijn in staat de dysbiose t.g.v. ulceratieve colitis gedeeltelijk te verbeteren (Cui et al., 2018; Li et al., 2020). Bij vleeskippen die gehouden worden onder een hoge bezettingsdichtheid, vermijdt berberine supplementatie de verlaging van *Lactobacilli* en de stijging van *E. coli* (Zhang et al., 2013). Echter is ook al vastgesteld dat berberine zelf dysbiose kan induceren o.a. door het verhogen van *Prevotellaceae*. Bij deze dieren is eveneens milde diarree als bijwerking vastgesteld. Mogelijks is de verkregen dysbiose hier de oorzaak van (Yue et al., 2019).

Waarschijnlijk speelt de modulatie van het microbiom een belangrijke rol in de mechanismen van de talrijke effecten van berberine. SCFA lijken hierin cruciale spelers, maar toch is het effect van berberine op de verschillende soorten SCFA variabel. Er is er eveneens veel variatie in de modulatie van de microbiota waarbij berberine zowel een dysbiose kan verhelpen als ze induceren. Een wijziging van het microbiom kan zoals reeds aangehaald ook de farmacokinetiek van berberine beïnvloeden waardoor de effecten van berberine ook gewijzigd kunnen worden.

4.6 Overige effecten

Naast de reeds genoemde effecten heeft berberine nog een reeds andere effecten namelijk metabole, antitumorale en neuroprotectieve effecten (Imenshahidi en Hosseinzadeh, 2016). Echter vallen deze buiten de scope van deze masterproef.

5 Toxiciteit en cancerogeniciteit

5.1 Algemene Veiligheid en bijwerkingen

Hoewel berberine en zijn plantenderivaten al lang gebruikt worden en vaak als veilig worden omschreven, is het aantal grondig uitgevoerde veiligheidsstudies zeer beperkt. In tabel 1 wordt een overzicht weergegeven van de algemene veiligheidsstudies. Voornamelijk de toedieningsweg en de diersoort blijken de toxiciteit te beïnvloeden. Zo is er ongeveer een 6x lagere LD₅₀ waargenomen bij een intraperitoneale toediening in vergelijking met een intraveneuze toediening bij muizen. In dezelfde studie kon de LD₅₀ van een orale toediening niet bepaald worden. Er werd namelijk nog geen 50% sterfte waargenomen bij een concentratie van 83,2 g/kg LG, een extreem hoge dosis (Kheir et al., 2010). Echter wordt er wel 50% sterfte of meer bekomen bij lagere concentraties in andere studies (Yeşilada en Küpeli, 2002; Yi et al., 2013).

De toxiciteit van berberine blijkt ook sterk diersoortafhankelijk. Muizen blijken tot 4x gevoeliger te zijn dan ratten bij een intra peritoneale toediening (Kulkarni et al., 1972; Kheir et al., 2010). Verschillende auteurs melden een onderzoek waarbij katten welke dagelijks 100 mg/kg LG berberine krijgen, sterven na 8 tot 10 dagen (Kamrani Rad et al., 2017; Singh en Sharma, 2018). De origine van deze informatie kon terug getraceerd worden naar een oud Russisch boek maar het onderzoek zelf werd niet gevonden waardoor de betrouwbaarheid van deze informatie onbekend is (Turova et al., 1962). Bij eenmalige intraperitoneale toediening van 5 tot 40 mg/kg LG berberine hydrochloride aan katten is geen sterfte waargenomen. Er zijn hierbij echter wel sterke sedatieve effecten, braken, urineren en defeceren waargenomen (Shanbhag et al., 1970). Katten zijn dus mogelijks zeer gevoelig aan berberine.

Bij humane klinische studies met berberine in het kader van metabole ziekten zijn een beperkt aantal milde gastro-intestinale bijwerkingen vastgesteld zoals misselijkheid, diarree, constipatie, abdominale distentie en pijn. Hierbij zijn dosissen gebruikt die ongeveer overeen stemmen met 8 tot 20 mg/kg LG voor een adult gewicht van 70kg (Lan et al., 2015). Bij toediening van 1 g/kg voer via de voeding aan kippen van dag 1 tot het einde van de afmestperiode zijn geen bijwerkingen noch een verschil in voederconversie en groei waargenomen (Yu et al., 2017a). Bij orale toediening van 2 g/kg LG is er eveneens geen sterfte waargenomen bij kippen (Malik et al., 2014). Kippen lijken berberine dus zeer goed te verdragen.

Hoewel de gebruikelijke dosis via orale weg als veilig wordt beschouwd is voorzichtigheid omtrent de veiligheid van de molecule aangewezen. Er zijn verschillende indicaties voor gastro-intestinale en immunologische negatieve gevolgen. Naast de reeds vermelde milde gastro-intestinale symptomen zijn maagulcers bij muizen reeds beschreven bij een eenmalig perorale toediening van 100 mg/kg LG. De incidentie hiervan is dosisafhankelijk en ook bij langdurige opname van lagere dosissen worden ulcers opgemerkt (Küpeli et al., 2002; Yeşilada en Küpeli, 2002). Bij langdurige toediening van berberine aan muizen zijn tekenen van immunosuppressie vastgesteld. Hierbij worden volgende zaken vastgesteld: daling van het totaal aantal witte bloedcellen, neutrofielen en lymfocyten in het bloed, daling van verschillende T-celpopulaties in de milt en een verlaagde antistofreactie op rode bloedcellen van schapen. Hierbij gaat het wel om een intraperitoneale toediening. Deze effecten zijn waargenomen vanaf 10mg/kg LG/dag (Mahmoudi et al., 2016).

Tabel 1. Overzicht van de beschreven toxiciteit in verschillende veiligheidsstudies van berberine. TW= toedieningsweg, DS= diersoort, IV= intraveneus, IP= intraperitoneaal, PO= per oraal.

| TW | DS | Waargenomen toxiciteit | Vorm | bron |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| IV | Muis | LD ₅₀ = 9,0386+-0.8003 mg/kg LG | Berberine hydrochloride | (Kheir et al., 2010) |
| IP | Muis | LD ₅₀ = 57,6103+- 23,3172 mg/kg LG | Berberine hydrochloride | (Kheir et al., 2010) |
| | Rat | LD ₅₀ = 205 mg/kg LG | Berberine sulfaat | (Kulkarni et al., 1972) |
| PO | Muis | LD ₅₀ = 713,57 mg/kg LG | Berberine uit Rhizoma Coptidis | (Yi et al., 2013) |
| | | LD ₅₀ = >209 (0 sterfte) - <418 (5/6 sterfte) mg/kg LG | Berberine uit <i>Berberis spp.</i> | (Yeşilada en Küpeli, 2002) |
| | | Tot 30% sterfte bij 41,6 g/kg LG en 83,2 g/kg LG | Berberine hydrochloride | (Kheir et al., 2010) |
| | | NOAEL = 569 mg/kg LG gedurende 14 dagen | Berberine chloride dihydraat | (Jahnke et al., 2006) |
| | Rat | Geen toxiciteit (klinisch, bloedbeeld, histopathologie en gewicht organen) bij 90 dagen 156 mg/kg LG/dag | Berberine uit Rhizoma Coptidis | (Yi et al., 2013) |
| | Kat | 100% sterfte bij 10 dagen 100 mg/kg LG 100 mg/kg LG | Berberine sulfaat | (Turova et al., 1962) |
| | Kip | Geen toxiciteit (klinische symptomen, darm en leverletsels, voederconversie, groei) bij 42 dagen 1g/kg voer/dag | Berberine chloride | (Yu et al., 2017a) |
| | | Geen sterfte bij 1x toediening van 2 g/kg LG | Berberine | (Malik et al., 2014) |
| Mens | 5-10% incidentie milde gastro-intestinale bijwerkingen bij langdurige toedieningen van 0,6g/dag -1,5 g/dag | Verschillende vormen | (Lan et al., 2015) | |

5.2 Effect op de reproductie

Het effect van berberine op de embryonale ontwikkeling staat onder discussie in de literatuur. Huang et al. (2018) stelden *in vitro* een verlaagde ontwikkeling, een verhoogde apoptose en een verhoogde BAX/Bcl-2 ratio vast bij embryo's van het morulla tot het blastocyst stadium. Er werd hierbij voornamelijk een verhoogde apoptose waargenomen in het trophoctoderm welke later de placenta vormt. Bovendien is er een verhoogde embryonale degeneratie vastgesteld bij muizen die rond het moment van conceptie intraperitoneaal behandeld werden met 6 mg/kg LG berberine. Deze bevindingen wijzen op een verstoring van de embryonale ontwikkeling voor de implantatie. Zhang et al. (2015) stelden echter tegengestelde bevindingen vast op de embryonale ontwikkeling van blastocysten *in vitro* zoals een versnelde ontwikkeling, verlaagde apoptose en een verhoogde expressie van Bcl-2.

Bij implantatie van met berberine behandelde embryo's wordt een verlaagde implantatieratio, een verlaagd aantal levende foeti en een verlaagd placentaal en foetaal gewicht waargenomen. Dit wijst op een verstoring van implantatie en de ontwikkeling daarna (Huang et al., 2018). Bij orale toediening van 1000 mg/kg LG berberine chloride dihydraat aan muizen van 6 tot 20 dagen dracht wordt eveneens een verlaging van het foetaal gewicht waargenomen. Echter kan men geen verschil aantonen bij andere parameters zoals het percentage van verlies voor de implantatie, het malformatiepercentage, het resorptiepercentage en het percentage laat foetale sterftes. Bij toediening van eenzelfde dosis bij ratten zijn eveneens geen afwijkende parameters aangetoond (Jahnke et al., 2006).

5.3 Interacties met andere geneesmiddelen

Doordat berberine een substraat is van bepaalde CYP450 enzymen en effluxproteïnen kan berberine potentieel de interactie van andere geneesmiddelen met deze componenten beïnvloeden. Op deze manier kan de biobeschikbaarheid van deze geneesmiddelen gewijzigd worden en kan er mogelijk toxiciteit van deze geneesmiddelen optreden.

5.3.1 CYP450 enzymen

Zowel bij de muis als bij de mens is er bij toediening van berberine gedurende 2 weken een verhoging van de activiteit van CYP3A en (homologen van) CYP2D6 waargenomen (Guo et al., 2011b, 2012). Bij de muis treedt deze activatie enkel op bij een concentratie van 300 mg/kg LG en niet bij dosissen van 10 tot 100 mg/kg LG (Guo et al., 2011b). Bij een dosis van 100 mg/kg LG is er ook geen wijziging van de farmacokinetiek van carbamazepine, een CYP3A substraat, vastgesteld (Qiu et al., 2009). Bij de mens wordt een activatie van CYP450 enzymen waargenomen bij een dosis van 900 mg/dag toegediend aan Chinese vrijwilligers. Hier wordt naast de reeds genoemde CYP450 enzymen ook een verhoging van de activiteit van CYP2C9 waargenomen (Guo et al., 2012).

5.3.2 P-gp

Een éénmalige orale toediening van 30 t.e.m. 100 mg/kg LG berberine in combinatie met de orale toediening van digoxine, een P-gp substraat, zorgt voor een dosisafhankelijke verhoging van de biobeschikbaarheid van digoxine bij de rat (Qiu et al., 2009). Bij kippen kan een verhoogde biobeschikbaarheid van oraal toegediende enrofloxacin vastgesteld worden bij berberine behandeling (80 mg/kg LG). Het inhiberend effect van berberine op de werking van P-gp gemedieerde efflux wordt zowel *in vitro* als *in vivo* vastgesteld bij de kip. *In vitro* is er vnl. een inhiberend effect vastgesteld op de efflux van tilmicosine en ciprofloxacin (Zhang et al., 2019b). Ook ivermectine en closantel zijn belangrijke P-gp substraten en ook hun farmacokinetiek wordt mogelijk beïnvloed door toediening van berberine (Ballent et al., 2014).

5.4 Cancerogeniciteit

Er zijn verschillende indicaties dat berberine mogelijk carcinogeen is. Bij toediening van *H. canadensis* gedurende 2 jaar aan ratten en mannelijke muizen is er een toename van het voorkomen van levertumoren waargenomen (National Toxicology Program, 2010). Berberine is in staat DNA-schade te induceren. Hoewel dit vnl. vastgesteld wordt in tumorceltypes is dit ook al bij normale cellen zoals bv. HepG2 cellen vastgesteld (Chen et al., 2013b; Kamrani Rad et al., 2017). Hierbij is er aangetoond dat berberine DNA-schade induceert door de inhibitie van topoisomerasen en zo de herstelmechanismen van DNA verstoort (Chen et al., 2013b). Ook bij bacteriën worden indicaties voor DNA-schade waargenomen (Karaosmanoglu et al., 2014).

5.5 Residuen

Doordat berberine mogelijk carcinogeen is, is het belangrijk om accidentele opname van berberine door mensen die dierlijke producten nuttigen, te vermijden. De residuen dienen dus best onder de detectielimiet gehouden te worden. De residuen zijn in kaart gebracht voor de kip bij een concentratie van 30 en 300 mg/kg voer/dag startende op de leeftijd van 1 dag tot de leeftijd van 35 dagen. Bij de laagste concentratie worden geen residuen boven de detectielimiet vastgesteld in drie verschillende spieren en de lever bij slachting op dag 35. Bij een dosis van 300 mg/kg voer/dag is een wachttijd van 4 dagen nodig zodat de residuen lager zijn dan de gevalideerde detectielimiet voor spieren. Voor de lever is hiervoor een wachttijd van 14 dagen nodig. De residuen zonder wachttijd zijn 11,6 ng/g en 35,2 ng/g voor de dijspier en de lever (Yu et al., 2017a).

6 Gebruik bij nutsdieren

6.1 Toepassingen

Door zijn multipiele farmacodynamische effecten kan toediening van berberine bij nutsdieren voordelig zijn in verschillende situaties. Omwille van zijn protectieve effecten op de darm kan berberine mogelijk een gezondheidsbevorderend effect hebben en zo infectie via de darm vermijden. Door zijn anti-inflammatoire effecten is berberine mogelijk geschikt om de negatieve effecten van een overmatige acute fase respons te verlichten. Dankzij het effect van berberine op de motiliteit, de secretie en de antimicrobiële effecten kan berberine mogelijk ingezet worden voor de preventie en de behandeling van enteritis. Ook bij andere ziekten waarin inflammatoire reacties een cruciale rol spelen kan berberine mogelijk ingezet worden.

6.1.1 Als groeibevorderaar

Groeibevorderende effecten door berberine zijn enkele keren beschreven bij gezonde dieren. Vaak zijn er echter geen effecten waargenomen van berberine op de groei van gezonde dieren.

Bij toediening van een extract van de wortel van *Berberis vulgaris* aan de voeding van vleeskippen gedurende heel de productieperiode kan een 10% hoger eindgewicht bekomen worden (Rajaian et al., 2006). Ook bij een toediening van berberine in het voer bij kippen gehouden onder een hogere densiteit wordt een hoger eindgewicht en dagelijkse groei bekomen in vergelijking met dieren die geen berberine kregen. Hierbij is er echter geen verschil waargenomen in de voederconversie. Dit wijst erop dat het hogere eindgewicht bekomen wordt door een hogere voeropname (Zhang et al., 2013). In de aquacultuur kan berberine supplementatie zorgen voor een verbetering van de groeiparameters inclusief de voederconversie (Xu et al., 2017; Doan et al., 2020). Bij varkens is het effect van de toediening van berberine onder de vorm van een kruidenmix (120 mg berberine/kg voer) vergeleken met toedieningen van antibiotica in het voer namelijk colistine en een antimicrobieel voederadditief halquinol. Het eindgewicht van varkens die berberine kregen was hoger dan varkens die halquinol kregen en gelijkaardig aan varkens die colistine kregen. Een lagere voederconversie en een hogere dagelijkse groei wordt opgemerkt bij toediening van berberine of colistine bij een 2^{de} batch die gehouden werd onder hogere bezettingsgraad (Tummaruk et al., 2009).

Er zijn echter in verschillende studies geen verschillen aangetoond tussen groeiparameters van berberine gesupplementeerde dieren en controledieren. Bij toediening van een extract van de wortel van *Berberis lycium* aan kippen en gedeeltelijke vervanging van het ruwvoer door vruchtenpulp van *Berberis spp.* bij lammeren is er geen effect vastgesteld op de groeiparameters (Chand et al., 2011; Moghaddam et al., 2019). Er kan eveneens geen impact op de groei worden vastgesteld bij varkens waarbij een combinatie van pre- en/of probiotica met berberine aan het voer werd toegevoegd (Fan et al., 2015; Xu et al., 2020). Daarenboven is er bij verschillende onderzoeken omtrent coccidiose en necrotische enteritis een negatieve impact vastgesteld van hoge concentraties berberine in het voer of het water, op de groeiparameters (Fang et al., 2016; Yu et al., 2017b).

6.1.2 Als gezondheidsbevorderend middel

Verschiedende positieve effecten van berberine op de gezondheid van varkens en kippen worden beschreven. Toediening van berberine in combinatie met pre- en probiotica zorgt voor een verlaagde incidentie van diarree bij varkens (Fan et al., 2015). Dit wordt ook waargenomen bij toediening van een combinatie van berberine met probiotica waarbij tevens een lagere sterfte en een lager afwijzingspercentage wordt waargenomen (Xu et al., 2020). Bij toediening van berberine onder de vorm van een kruidenmix wordt, net zoals bij toevoeging van colistine, een lager aantal biggen met groeivertraging vastgesteld dan bij toediening van halquinol (Tummaruk et al., 2009).

Na spenen zijn er wijzigingen in het intestinaal microbioom wijzend op een versnellende ontwikkeling en maturatie van het microbioom vastgesteld bij toediening van berberine in combinatie met probiotica na het spenen (Xu et al., 2020).

Bij kippen gehouden in hoge bezetting kan toediening van berberine het overvloedig voorkomen van *E. coli* in het microbioom omkeren (Zhang et al., 2013). Toedienen van berberine onder de vorm van *B. vulgaris* heeft een positief effect op de villuslengte en oppervlakte van de duodenum bij kippen (Yazdani et al., 2013). Dit wijst mogelijk op een hogere absorptiecapaciteit. Supplementatie met een *B. lycium* extract verhoogt de antistoftiters tegen de ziekte van Gumboro en Newcastle disease. Het effect van *B. lycium* is hierbij wel kleiner bij kippen die gevaccineerd werden (Chand et al., 2011).

6.1.3 Als modulator van de acute fase respons

De acute fase respons treedt op bij stress, trauma en infectie. Deze respons wordt o.a. getriggerd door LPS afkomstig van gramnegatieve bacteriën zoals *E. coli* en *Salmonella spp.*. Deze acute fase respons heeft naast inflammatie ook verschillende andere gevolgen. Deze zorgt voor een verhoogde voederconversie, verlaagd lichaamsgewicht, vergroting van de lever, een verlaging van de botsterkte en kan mogelijks leiden tot sterfte (Mireles et al., 2005). Enkele onderzoeken tonen aan dat berberine de acute fase respons uitlokt door LPS kan reduceren.

Shen et al. (2010) lokten eenmalig een acute fase respons uit met LPS en dienden individueel 15 mg/kg LG/dag berberine toe vanaf 2 dagen voor de uitlokkings. Dieren die op deze manier behandeld werden hebben een hoger gewicht, een lager relatief levergewicht, een lage voederconversie en een hogere voederopname in vergelijking met de onbehandelde dieren. Hierbij komen deze waarden van de behandelde dieren ongeveer overeen met die van de niet LPS blootgestelde onbehandelde dieren. Bij behandelde dieren wordt eveneens geen stijging van heterofielen en lymfocyten opgemerkt, in tegenstelling tot de onbehandelde groep. Ook wordt er 24u na de LPS injectie een daling van IL-6 vastgesteld in vergelijking met de onbehandelde dieren (Shen et al., 2010).

Bij een herhaalde toediening van LPS is er eveneens een positief effect van berberine op de groeiparameters van vleeskippen vastgesteld. Hierbij werd berberine via het voer toegediend gedurende de hele productieperiode (60mg/kg voer). Er wordt hierbij eveneens een verlaging van de pro-inflammatoire cytokines en een verhoging van antioxidanta waargenomen. Berberine supplementatie zorgt ook voor een verlaging van MDA, een indicator van oxidatieve stress (Yang et al., 2019).

6.1.4 Preventie en behandeling van enteritis

6.1.4.1 Enterotoxigene colibacillose bij zoogdieren

E. coli is een oorzaak van verschillende ziektebeelden bij verschillende diersoorten. Bij varkens speelt deze voornamelijk een rol bij neonatale diarree en speendiarree, bij herkauwers is het een belangrijke veroorzaker van neonatale diarree. ETECs produceren enterotoxines met STa, STb en LT als voornaamste. Deze enterotoxines induceren een verhoogde secretie via de mechanismen beschreven in 4.5.3. Deze verhoogde secretie zorgt voor dehydratatie en verminderde absorptie van nutriënten. Deze nutriënten komen ter beschikking van de microbiota t.h.v. het colon en induceren een dysbiose en een D-lactatemie. Ten gevolge van de inflammatie en de verminderde absorptie van voedingsstoffen t.h.v. de darm ontstaat gewichtsverlies.

Verschillende eigenschappen van berberine zouden deze ziekte kunnen verlichten. Berberine heeft *in vitro* een goede antibacteriële activiteit tegen multidrugresistente ETEC stammen geïsoleerd uit jaks met hemorragische diarree (Bandyopadhyay et al., 2013). Eveneens kan de enterotoxine geïnduceerde secretie welke dehydratatie veroorzaakt, door berberine gereduceerd worden (zie 4.5.3). De inhibitie van de secretie geïnduceerd door ST toxines is ook specifiek aangetoond bij een darmlusmodel van het varken (Zhu en Ahrens, 1982).

Daarenboven wordt er bij jejunale porcine enterocyten welke werden blootgesteld aan berberine, een sterk verminderde adhesie van ETEC vastgesteld (Liu et al., 2019c). Berberine zou eveneens de kans op translocatie van ETEC en andere pathogenen naar de bloedbaan kunnen verkleinen door de darmbarrière te versterken (Gu et al., 2011; Li et al., 2014).

Er zijn enkele studies uitgevoerd omtrent het therapeutisch effect van berberine op ETEC bij de mens. Bij de mens wordt in een gerandomiseerde gecontroleerde studie een reductie met 48% van het volume van de feces en een reductie met 20% van het aantal patiënten met lopende feces waargenomen bij berberine behandeling van bevestigde humane ETEC diarree gevallen (Rabhani et al., 1987). Klinische studies bij varkens en neonatale herkauwers zijn nodig om het therapeutisch en het preventief effect van berberine op ETEC vast te stellen.

6.1.4.2 Coccidiose en necrotische enteritis bij de kip

Coccidiose is een vaak voorkomende aandoening in de intensieve pluimveehouderij. *Eimeria spp.* veroorzaken enteritis met (bloederige) diarree, conditieverlies en een verhoogde voederconversie. Hierdoor heeft de ziekte een grote economische impact. Verschillende *Eimeria spp.* kunnen coccidiose veroorzaken. *Eimeria tenella* is de meest pathogene en resulteert in een hemorragische typhlitis (Trees, 2008). In de farmacodynamiek werd het effect van berberine op de oöcyst uitscheiding reeds beschreven. Er zijn reeds enkele klinische studies uitgevoerd over het effect van berberine op een *E. tenella* infectie.

Fang et al. (2016) en Zhu et al. (2019b) gebruikten hierbij een dosis van 300mg/kg LG/dag via een individuele toediening. Hierbij werd respectievelijk een dag voor de infectie of de dag van de infectie gestart en deze therapie werd voortgezet tot 8 dagen na de infectie. Deze onderzoeken staan model voor een preventieve toediening. De OPG op 5 dagen post-infectie is bij deze behandeling 30% tot 40% van de OPG van onbehandelde dieren. In beide onderzoeken wordt bij de behandelde dieren een reductie van de letsels waargenomen. Fang et al. (2016) merkten bovendien op dat de gewichtsaanzet van behandelde dieren steeds positief blijft terwijl onbehandelde dieren een negatieve gewichtsaanzet hebben vanaf dag 6 post-infectie. Zhu et al. (2019b) stelden een vermindering van de bloederige diarree en een 30% hoger overlevingspercentage vast. Berberinebehandeling is hierbij wel minder effectief dan een amprolium behandeling waarbij geen bloederige diarree, een sterkere reductie van OPG en hoger overlevingspercentage wordt waargenomen. Een sterkere concentratie van berberine, namelijk 1500 mg/kg LG/dag, geeft een verdere reductie van de OPG en de darmletsels maar zorgt voor een groter gewichtsverlies in vergelijking met de lagere concentratie (Fang et al., 2016).

Het onderzoek van Malik et al. (2014, 2016) staat eerder model voor een therapeutisch gebruik waarbij een berberinebehandeling gegeven werd vanaf 5 dagen post-infectie tot 9 dagen post-infectie. Hierbij werd 100 mg/kg LG/dag toegediend. Vanaf vier tot vijf dagen post-infectie treden vaak de 1^{ste} symptomen op. Na de behandeling is er een OPG bekomen die minder dan 1% van de onbehandelde dieren betreft. Er is ook een significant hoger gewicht vastgesteld na de behandeling namelijk 243-292g hoger dan onbehandelde dieren (Malik et al., 2014). Hierbij is er ook een verlaging van de voederconversie waargenomen. Deze effecten zijn gelijk aan de effecten van amprolium en bij combinatie van amprolium en berberine wordt eveneens een synergistisch effect waargenomen (Malik et al., 2014, 2016).

Coccidiose is een predisponerende factor voor het ontstaan van necrotische enteritis. Het belang van necrotische enteritis is de laatste jaren toegenomen omwille van de beperkingen van het antibioticumgebruik. Necrotische enteritis wordt veroorzaakt door *Clostridium perfringens* en heeft een grote economische impact in de pluimveehouderij. De ernst van de ziekte varieert tussen milde vormen, met een verhoogde voederconversie en met verlaagde groei als gevolg, en ernstige vormen, met hoge mortaliteit (Kaldhusdal en Jordan, 2008).

Het preventief potentieel van berberine tegen de ziekte is onderzocht bij vleeskuikens. Berberine werd gedurende de starterperiode (1-16 dagen) aan het water toegevoegd in een concentratie van 1,0 g/L. De vleeskuikens werden vervolgens geïnfecteerd met verschillende *Eimeria spp.* op dag 9 en met *C. perfringens* op dag 14. Het mortaliteitspercentage bij de onbehandelde groep was 83% t.o.v. geen mortaliteit in de behandelde groep. Ook de letselscore van de darm is merkkelijk beter bij de behandelde dieren. Echter is er wel een significante daling van voeder en wateropname bij de behandelde dieren, ook bij dieren die niet geïnfecteerd werden. Dit resulteert in een lager lichaamsgewicht. Mogelijks wordt dit veroorzaakt door de bittere smaak van berberine. Een lagere concentratie van 0.1g/L water zorgt slechts voor een minieme reductie in de mortaliteit (Yu et al., 2017b).

6.1.5 Behandeling van *Riemerella anatipestifer* bij de eend

Deze ziekte komt vnl. voor bij jonge eenden in intensieve systemen. *R. anatipestifer* veroorzaakt een acute polyserositis. Het kent een hoge morbiditeit en een variabele mortaliteit afhankelijk van het serovar. Deze kan echter zeer hoog zijn waardoor de economische impact zeer aanzienlijk kan zijn (Bisgaard et al., 2008). Bij toediening van 200 mg/kg LG/dag berberine vanaf de dag van infectie tot 2 weken post-infectie wordt een sterk verhoogd overlevingspercentage vastgesteld in vergelijking met de onbehandelde dieren namelijk een stijging van 45% naar 76%. Opmerkelijk worden er ook verlaagde bacteriële aantallen gevonden in de lever en de milt. De expressie van IL-17A, IL-17F, IL-6 en IL-1 β is gereduceerd bij met berberine behandelde dieren (Fernandez et al., 2017). Een verhoogde expressie van deze cytokines wordt geassocieerd met een verhoogde vatbaarheid van *R. anatipestifer* (Fernandez et al., 2016).

6.1.6 Preventie en behandeling van endometritis, mastitis en rumenitis bij het rund

Endometritis, mastitis en rumenitis zijn vaak voorkomende problemen in de melkveehouderij. Endometritis wordt voornamelijk veroorzaakt door gramnegatieve bacteriën die via LPS de inflammatie initiëren. De inflammatie bij een mastitis veroorzaakt door *E. coli* of *Klebsiella pneumoniae* wordt op gelijkaardige manier geïnitieerd. Rumenitis is een vaak voorkomend gevolg van subacute pensacidose en wordt geassocieerd met een hoge aanwezigheid van LPS. Doordat berberine de TLR4 activatie door LPS verhindert lijkt dit dus een potentieel preventief en therapeutisch middel hiervoor (Chu et al., 2014). De inflammatie t.g.v. LPS kan *in vitro* geïnhibeerd worden bij pensepitheelcellen (Zhao et al., 2019). Bij de muis kan een intraperitoneale berberine behandeling startend één uur voor de LPS infusie van enerzijds de uier en anderzijds de baarmoeder zorgen voor een histologisch waarneembare reductie van de inflammatie gelijkaardig aan een dexamethasone behandeling. In beide modellen wordt eveneens een verlaging van pro-inflammatoire cytokines vastgesteld (Fu et al., 2015; Wang et al., 2018). Berberine heeft eveneens een synergistisch effect met enkele vaak gebruikte antibiotica tegen multiresistente *Staphylococcus epidermidis* stammen afkomstig van koeien met klinische mastitis (Zhou et al., 2015).

Er zijn echter nog geen *in vivo* studies uitgevoerd bij runderen zelf. Er is ook nog niet onderzocht hoe berberine het ruminale microbiom beïnvloedt en in welke mate dit microbiom berberine afbreekt of dit metaboliseert.

6.2 Toedieningswijzen

Toediening van berberine bij de kip en het varken zou via het water en het voer kunnen gebeuren. Bij toediening van 1,0g/L water wordt een sterk verminderde wateropname en voeropname opgemerkt. Bij toediening via het voeder van 2.0 g/kg voer kan geen verschil aangetoond in voederopname, en in het eindgewicht. Er wordt hierbij wel een verhoogde wateropname vastgesteld in de behandelde groepen. In deze studie zou de opgenomen dosis van berberine ongeveer gelijkaardig zijn bij 1.0g/L water en 2.0g/kg voer uitgaande van een normale water en voeropname (Yu et al., 2017b). Waarschijnlijk is vnl. de erg bittere smaak van berberine de oorzaak van de verminderde water en voeropname bij supplementatie van berberine via het water. Bij toevoeging via het voeder wordt deze smaak meer gemaskeerd door de andere bestanddelen van de voeding. Mogelijks leiden hoge dosissen berberine ook tot een verminderde eetlust. Bij een onderzoek van Fang et al. (2016) heeft een individueel toegediende dosis van 1500 mg/kg LG/dag eveneens een negatief effect op de gewichtsaanzet van vleeskippen.

De bittere smaak van berberine vormt de grootste uitdaging voor zijn toediening. Zoetere vormen van berberine zijn beschreven namelijk berberine saccharine en berberine acesulfame. Berberine chloride wordt door 80% van de testpersonen als erg tot extreem bitter beschreven terwijl slechts 50% de zoetere vormen als bitter omschreven. Deze zijn echter minder wateroplosbaar dan berberine chloride (Wang et al., 2016). Hierdoor lijken ook deze vormen minder geschikt voor toediening via het water. Mogelijks wordt de smaak ook beter verdragen in de voeding als berberine onder de vorm van plantenextracten en kruidenmengelingen gegeven wordt.

De gebruikte dosissen in de verschillende dierstudies zijn zeer divers. Voor behandeling en preventie van coccidiose bij kippen zijn dosissen van 100 - 300 mg/kg LG/dag beschreven (Malik et al., 2014; Fang et al., 2016; Zhu et al., 2019b). De beschreven dosissen voor het moduleren van de acute fase respons bij kippen zijn 15 mg/kg LG en 60 mg/kg voer (Shen et al., 2010; Yang et al., 2019). Voor de behandeling van necrotische enteritis is een dosis van 1,0g/ L water beschreven. Bij varkens is berberine niet als enige bestanddeel toegevoegd aan het voer maar steeds in combinatie met pre- en/of probiotica of in een kruidenmix. Het betreft hierbij een hoeveelheid berberine van 56,8 mg/kg voer tot 200 mg/kg voer (Tummaruk et al., 2009; Fan et al., 2015; Xu et al., 2020).

Ook de duur van de toediening heeft mogelijks een impact op de grootte van de waargenomen effecten. Zo wordt bij vissen opgemerkt dat de groeiparameters het best zijn bij een niet continue toediening. Bij de afwisseling van het toedienen van berberine via het voer gedurende 2 weken met een periode van 2 weken zonder toediening worden de beste groeiparameters behaald (Xu et al., 2017). Verder onderzoek is vereist om het beste toedieningsschema van berberine bij de kip en het varken te bepalen.

Voor runderen zijn er nog geen klinische studies verricht op het doeldier zelf waardoor er weinig geweten is over de mogelijke toedieningswegen en dosissen.

DISCUSSIE

Berberine is een molecule die dankzij zijn veelzijdige diverse eigenschappen potentieel voordelig is bij verschillende toepassingen. De beïnvloeding van cellulaire signaalpathways lijkt het voornaamste mechanisme van berberine te zijn. Vnl. MAPKs, NF- κ B en AMPK blijken een essentiële rol te hebben in de werking van berberine. Hiernaast speelt ook het intestinale microbioom een cruciale rol bij de toediening van berberine. Enerzijds heeft het een grote rol in de farmacokinetiek van berberine en bepaalt het zo de concentratie van berberine en zijn metabolieten t.h.v. de darm en in het bloed. Zo wordt bijvoorbeeld ook oxyberberine gevormd, een molecule die actiever blijkt dan berberine zelf. Anderzijds is de beïnvloeding van het microbioom een mechanisme in verschillende farmacodynamische effecten van berberine. Berberine moduleert namelijk de microbiota waardoor ook de productie van de metabolieten gevormd door deze microbiota wijzigt, zoals bijvoorbeeld de productie van korte-keten vetzuren. De eerder lage absorptiegraad van berberine en de waarschijnlijke aanwezigheid van een enterohepatische kringloop zorgt ervoor dat de microbiota wel degelijk sterk blootgesteld worden aan berberine en zijn metabolieten.

Hoewel berberine omwille van zijn farmacodynamische eigenschappen mogelijks geschikt is voor toepassingen in de nutsdierensector zijn er twee grote hinderpalen. Allereerst heeft berberine een sterk bittere smaak welke de opname verhindert. Dit is vnl. aangetoond bij het gebruik van berberine als drinkwateradditief. Bij de kip lijkt de invloed van berberine als voederadditief op de opname eerder beperkt maar bij varkens is hier weinig over geweten. Er is namelijk enkel onderzoek gedaan met berberine als voederadditief in combinatie met andere additieven en in eerder lage concentraties. Zoetere vormen van berberine kunnen hiervoor mogelijks een oplossing zijn. Ook berberine bevattende plantenextracten kunnen de bittere smaak reduceren. De hoeveelheid van berberine hierin is echter vaak variabel en de andere bestanddelen van deze extracten kunnen mogelijk tegenstrijdige effecten hebben. Een tweede probleem betreft de complexe farmacokinetiek waarbij de concentratie van berberine sterk kan variëren t.g.v. verschillende factoren. Diersoort, ziekte, inname met andere geneesmiddelen en individuele verschillen hebben een impact op de concentratie van berberine en zijn metabolieten t.h.v. darm en in het bloed. Hierdoor wordt de dosering complex en kunnen de gewenste effecten soms niet behaald worden of kunnen toxische effecten optreden. Farmacokinetische onderzoeken bij doeldiersoorten zijn dus cruciaal.

Door de bevordering van de darmgezondheid, de anti-diarree effecten, het antimicrobieel mechanisme en de anti-inflammatoire effecten heeft berberine voornamelijk potentieel om ingezet te worden als preventief middel in de pluimvee en varkenshouderij. Bij de kip is de preventie maar ook de behandeling van coccidiose het best onderbouwd waarbij het effect van berberine vergelijkbaar was met een huidig gebruikt coccidiostaticum. Er zijn ook sterke indicaties voor toepassing als middel tegen de negatieve gevolgen van necrotische enteritis. Berberine lijkt eveneens een mogelijk additief voor een verbeterde groei bij ziekteprocessen, bij acute inflammatie responsen t.g.v. een hoge hoeveelheid LPS en bij een hoge bezettingsgraad. Bij gezonde dieren onder normale bezetting lijkt berberine eerder geen effect te hebben op de groei. Verder dient ook vermeld te worden dat de meeste onderzoeken gebruik maken van weinig replicaten waardoor de resultaten toch voorzichtig geïnterpreteerd dienen te worden. Berberine is dus mogelijk in staat het groeiverlies veroorzaakt door ziekte en hoge bezetting te vermijden. De juiste dosis is echter van belang. Bij een te hoge dosis kan bij langdurige toediening een immunosuppressief effect ontstaan wat de dieren vatbaarder zou maken voor infecties.

Het gebruik bij varkens werd slechts onderzocht in combinatie met ander additieven waardoor weinig geweten is over het effect van berberine zelf bij deze dieren. Uit deze onderzoeken blijkt wel dat berberine zowel in combinatie met andere kruiden als met pre- en probiotica een positieve invloed heeft op de darmgezondheid, het intestinaal microbioom en de preventie van diarree en achterblijvers.

Hierbij bleek de supplementatie van deze combinaties een gelijkaardig effect te hebben als antibiotica in de voeding. Bij antibiotica supplementatie wordt echter geen of een negatief effect waargenomen op het intestinaal microbiom. Hierdoor komt berberine al dan niet in combinatie met andere additieven in aanmerking als alternatief voor preventief toegediende antibiotica. Er dient genuanceerd te worden dat twee van de drie onderzoeken een klein aantal replicaten gebruikten. Er is dus meer onderzoek nodig met een groter aantal replicaten bij zowel gezonde dieren als bij geïnfecteerde dieren om het preventief effect van berberine t.o.v. bv. speendiarree te evalueren. Net zoals bij de kip is evaluatie van de dosis belangrijk omwille van de immunosuppressieve en eetlustremmende effecten van berberine bij te hoge dosissen.

Het anti-inflammatoir effect van berberine zorgde voor interesse in de molecule in preventie en behandeling van verschillende ontstekingen in de melkveehouderij. Het gaat hierbij om LPS geïnduceerde inflammatie waarbij berberine vnl. TLR4 gemedieerde NF- κ B activatie inhibeert. Hoewel de effecten van berberine zeker gewenst zouden zijn bij mastitis, endometritis en rumenitis en de eerste *in vitro* resultaten en de *in vivo* resultaten bij de muis belovend zijn, zijn er toch nog verschillende praktische problemen die onderzocht dienen te worden. Zo zou berberine bij volwassen runderen en jongvee waarschijnlijk worden afgebroken in de pens en op die manier enkel een mogelijk effect hebben op rumenitis. Berberine zal echter ook een effect hebben op het pensmicrobiom. Dit kan zowel een positief als negatief effect zijn. Verder onderzoek naar de interactie tussen berberine en het pensmicrobiom is dus noodzakelijk. Voor de behandeling van endometritis en mastitis zou een systemische toediening een alternatief zijn. Dit verhoogt echter sterk de kans op toxische bijwerkingen. Misschien kan hierbij een topicale toediening van berberine t.h.v. de uier en de baarmoeder wel een oplossing zijn. Ook dit dient verder onderzocht te worden.

Naast de reeds (beperkte) onderzochte toepassingen zou berberine ook mogelijks een rol kunnen hebben bij de behandeling van virale aandoeningen waarbij vnl. gedacht wordt aan bepaalde ademhalingspathogenen zoals RSV en influenzavirussen. Door synergisme van berberine met verschillende antibiotica zou berberine mogelijk ook de werking van antibiotica kunnen verbeteren bij een gelijktijdige toediening. Berberine zou hierbij ook de bereikbaarheid van biofilmvormende bacteriën kunnen verbeteren doordat deze de biofilmvorming inhibeert. De concentraties waarbij inhibitie van biofilmvorming wordt waargenomen zijn echter veel hoger dan de systemische concentratie aan berberine na per orale toediening. Mogelijks is de concentratie in de darmwand wel voldoende hoog na per orale toediening. Ook zijn verschillende antibiotica P-gp substraten en zorgt berberine mogelijks voor een hogere opname. Mogelijks zou daardoor de dosering van antibiotica verlaagd kunnen worden.

Aangezien berberine potentieel toxische en carcinogene effecten heeft en de effecten van langdurige toediening niet goed gekend zijn is het zeker belangrijk om ongewilde opname van berberine door consumenten van dierlijke producten te vermijden. Naast studies naar de werkzame dosissen dienen ook grondige residu studies uitgevoerd te worden om een gepaste wachttijd te kunnen opstellen en de veiligheid voor mensen te garanderen.

Er dient ook vermeld te worden dat deze masterproef enkel Engelstalige literatuur bevat en dat er mogelijks veel meer geweten is over berberinegebruik in de nutsdiersector aangezien deze voornamelijk in Azië wordt onderzocht.

Door zijn talrijke effecten is berberine een beloftevolle molecule bij de preventie en de behandeling van ziektes in de intensieve veehouderij. De huidige onderzoeken wijzen op een protectief effect van berberine tegen verschillende pathogenen, inflammatie en algemene stress door overbezetting. Hierdoor kan berberine mogelijks deel uitmaken van een strategie om de reductie van het gebruik van antibiotica op te vangen. Verder onderzoek is echter nodig om deze effecten te bevestigen alsook onderzoek naar farmacokinetiek, toxiciteit en residuen bij de verschillende doeldiersoorten.

REFERENTIELIJST

- Aolga, R.N., Fan, Y., Chen, Z., Liu, L.-W., Zhao, Y.-J., Li, J., Chen, Y., Lai, M.-D., Li, P., Qi, L.-W., 2016. Significant pharmacokinetic differences of berberine are attributable to variations in gut microbiota between Africans and Chinese. *Scientific Reports* 6, 27671.
- Alves de Almeida, A.C., de-Faria, F.M., Dunder, R.J., Manzo, L.P.B., Souza-Brito, A.R.M., Luiz-Ferreira, A., 2017. Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis: Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017, 1–24.
- Alzamora, R., O'Mahony, F., Ko, W.H., Yip, T.W.N., Carter, D., Irnaten, M., Harvey, B.J., 2011. Berberine reduces cAMP-induced chloride secretion in T84 human colonic carcinoma cells through inhibition of basolateral KCNQ1 channels. *Frontiers in Physiology* 2, 33.
- Amsen, D., Spilianakis, C.G., Flavell, R.A., 2009. How are TH1 and TH2 effector cells made? *Current Opinion in Immunology* 21, 153–160.
- Andola, H.C., Gaira, K.S., Rawal, R.S., Rawat, M.S.M., Bhatt, I.D., 2010. Habitat-Dependent Variations in Berberine Content of *Berberis asiatica* Roxb. ex. DC. in Kumaon, Western Himalaya. *Chemistry & biodiversity* 7, 415–420.
- Artursson, P., Karlsson, J., 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 880–885.
- Aswathanarayan, J.B., Vittal, R.R., 2018. Inhibition of biofilm formation and quorum sensing mediated phenotypes by berberine in: *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*. *RSC Advances* 8, 36133–36141.
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., et al., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*.
- Ball, A.R., Casadei, G., Samosorn, S., Bremner, J.B., Ausubel, F.M., Moy, T.I., Lewis, K., 2006. Conjugating Berberine to a Multidrug Resistance Pump Inhibitor Creates an Effective Antimicrobial. *ACS Chemical Biology* 1, 594–600.
- Ballent, M., Maté, L., Virkel, G., Sallovitz, J., Viviani, P., Lanusse, C., Lifschitz, A., 2014. Intestinal drug transport: Ex vivo evaluation of the interactions between ABC transporters and anthelmintic molecules. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 37, 332–337.
- Balouiri, M., Sadiqi, M., Ibsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71–79.
- Bandyopadhyay, S., Patra, P.H., Mahanti, A., Mondal, D.K., Dandapat, P., Bandyopadhyay, S., Samanta, I., Lodh, C., Bera, A.K., Bhattacharyya, D., et al., 2013. Potential antibacterial activity of berberine against multi drug resistant enterovirulent *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) with haemorrhagic diarrhoea. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6, 315–319.
- Battu, S.K., Repka, M.A., Maddineni, S., Chittiboyina, A.G., Avery, M.A., Majumdar, S., 2010. Physicochemical characterization of berberine chloride: A perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *AAPS PharmSciTech* 11, 1466–1475.
- Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E., 2004a. Introduction, in: *Chinese Herbal Medicine. Materia Medica*. Eastland Press, Seattle, pp. xiii–xxxi.
- Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E., 2004b. Herbs that clear heat: *Coptidis Rhizoma*, in: *Chinese Herbal Medicine. Materia Medica*. Eastland Press, Seattle, pp. 134–138.
- Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E., 2004c. Herbs that Clear Heat: *Phellodendri cortex*, in: *Chinese Herbal Medicine. Materia Medica*. Eastland Press, Seattle, pp. 138–141.
- Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E., 2004d. Herbs that Regulate the Blood: *Corydalis Rhizoma*, in: *Chinese Herbal Medicine. Materia Medica*. Eastland Press, Seattle, pp. 606–609.
- Bisgaard, M., Bojesen, A.M., Christensen, J.P., 2008. *Riemerella* infections, in: *Poultry Diseases*. Elsevier Ltd, Philadelphia, pp. 172–175.
- Boberek, J.M., Stach, J., Good, L., 2010. Genetic Evidence for Inhibition of Bacterial Division Protein FtsZ by berberine. *PLoS ONE* 5, e13745.
- Cao, M., Wang, P., Sun, C., He, W., Wang, F., 2013. Amelioration of IFN- γ and TNF- α -Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Berberine via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Signaling Pathway. *PLoS ONE* 8, e61944.
- Cecil, C.E., Davis, J.M., Cech, N.B., Laster, S.M., 2011. Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *International Immunopharmacology* 11, 1706–1714.
- Chand, N., Durrani, F.R., Ahmad, S., Khan, A., 2011. Immunomodulatory and hepatoprotective role of feed-added *Berberis lycium* in broiler chicks. *Journal of the science of Food and Agriculture* 91, 1737–1745.

- Chen, C., Lu, M., Pan, Q., Fichna, J., Zheng, L., Wang, K., Yu, Z., Li, Y., Li, K., Song, A., et al., 2015a. Berberine Improves Intestinal Motility and Visceral Pain in the Mouse Models Mimicking Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome (IBS-D) Symptoms in an Opioid-Receptor Dependent Manner. *PLoS ONE* 10, e0145556.
- Chen, D.-P., Xiong, Y.-J., Lv, B.-C., Liu, F.-F., Wang, L., Tang, Z.-Y., Lin, Y., 2013a. Effects of berberine on rat jejunal motility. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65, 734–744.
- Chen, H., Zhang, F., Li, R., Liu, Y., Wang, X., Zhang, X., Xu, C., Li, Y., Guo, Y., Yao, Q., 2020. Berberine regulates fecal metabolites to ameliorate 5-fluorouracil induced intestinal mucositis through modulating gut microbiota. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 124, 109829.
- Chen, J., Li, W., Yao, H., Xu, J., 2015b. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia* 103, 231–241.
- Chen, L., Bu, Q., Xu, H., Liu, Y., She, P., Tan, R., Wu, Y., 2016a. The effect of berberine hydrochloride on *Enterococcus faecalis* biofilm formation and dispersion in vitro. *Microbiological Research* 186–187, 44–51.
- Chen, S., Wan, L., Couch, L., Lin, H., Li, Y., Dobrovolsky, V.N., Mei, N., Guo, L., 2013. Mechanism study of goldenseal-associated DNA damage. *Toxicology letters* 221, 64–72.
- Chen, W., Miao, Y.-Q., Fan, D.-J., Yang, S.-S., Lin, X., Meng, L.-K., Tang, X., 2011. Bioavailability Study of Berberine and the Enhancing Effects of TPGS on Intestinal Absorption in Rats. *AAPS PharmSciTech* 12, 705–711.
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L., Li, J., 2016b. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters* 370, 153–164.
- Cho, Y.-J., 2011. Anti-inflammatory Effect of Jatrorrhizine from *Phellodendron amurense* in Lipopolysaccharide-stimulated Raw264.7 Cells. *Journal of Applied Biological Chemistry* 54, 114–119.
- Chu, M., Ding, R., Chu, Z.-Y., Zhang, M., Liu, X., Xie, S., Zhai, Y., Wang, Y., 2014. Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14, 89.
- Chu, M., Zhang, M.B., Liu, Y.C., Kang, J.R., Chu, Z.Y., Yin, K.L., Ding, L.Y., Ding, R., Xiao, R.X., Yin, Y.N., et al., 2016. Role of berberine in the treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus infections. *Scientific Reports* 6, 24748.
- Committee on Herbal Medicinal Products, 2011. Assessment report on *Chelidonium majus* L., herba - EMA/HMPC/369801/2009. European Medicines Agency, London.
- Cui, G., Qin, X., Zhang, Y., Gong, Z., Ge, B., Zang, Y.Q., 2009. Berberine Differentially Modulates the Activities of ERK, p38 MAPK, and JNK to Suppress Th17 and Th1 T cell Differentiation in Type 1 Diabetic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 284, 28420–28429.
- Cui, H., Cai, Y., Wang, L., Jia, B., Li, J., Zhao, S., Chu, X., Lin, J., Zhang, X., Bian, Y., et al., 2018. Berberine Regulates Treg/Th17 Balance to Treat Ulcerative Colitis Through Modulating the Gut Microbiota in the Colon. *Frontiers in Pharmacology* 9, 571.
- Cunningham, K.E., Turner, J.R., 2012. Myosin light chain kinase: Pulling the strings of epithelial tight junction function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1258, 34–42.
- Dao, M.C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E.O., Kayser, B.D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., et al., 2016. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 65, 426–436.
- De Ree, J.M., Schwillens, P., van den Bosch, J.F., 1987. Monoclonal antibodies raised against *Pap fimbriae* recognize minor component(s) involved in receptor binding. *Microbial Pathogenesis* 2, 113–121.
- Dev, S., 2006. A selection of Prime Ayurvedic Plants Drugsancient - Modern Concordance. Anamaya Publishers, New Delhi.
- Dianxiang, Z., Hartley, T.G., 2008. *Phellodendron*, in: *Flora of China*. Vol. 11 (Oxalidaceae through Aceraceae). Science press, Missouri Botanical Garden Press, Beijing, St. Louis, pp. 75–76.
- Diaz, G.J., Murcia, H.W., Cepeda, S.M., 2010. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of aflatoxin B1 in chickens and quail. *Poultry Science* 89, 2461–2469.
- DiGuilio, K.M., Mercogliano, C.M., Born, J., Ferraro, B., To, J., Mixson, B., Smith, A., Valenzano, M.C., Mullin, J.M., 2016. Sieving characteristics of cytokine- and peroxide-induced epithelial barrier leak: Inhibition by berberine. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 7, 223.
- Dkhil, M.A., Metwaly, M.S., Al-Quraishy, S., Sherif, N.E., Delic, D., Al Omar, S.Y., Wunderlich, F., 2015. Anti-*Eimeria* activity of berberine and identification of associated gene expression changes in the mouse jejunum infected with *Eimeria papillata*. *Parasitology Research* 114, 1581–1593.
- Doan, H. Van, Hoseinifar, S.H., Jaturasitha, S., Dawood, M.A.O., Harikrishnan, R., 2020. The effects of berberine powder supplementation on growth performance, skin mucus immune response, serum immunity, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture* 520, 734927.
- Domadia, P.N., Bhunia, A., Sivaraman, J., Swarup, S., Dasgupta, D., 2008. Berberine Targets Assembly of *Escherichia coli* cell Division Protein FtsZ. *Biochemistry* 47, 3225–3234.

- Ettefagh, K.A., Burns, J.T., Junio, H.A., Kaatz, G.W., Cech, N.B., 2011. Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) Extracts Synergistically Enhance the Antibacterial Activity of berberine via Efflux Pump Inhibition. *Planta Medica* 77, 835–840.
- Fagerholm, U., Johansson, M., Lennernäs, H., 1996. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical Research* 13, 1336–1342.
- Fan, G., Chang, J., Yin, Q., Wang, X., Dang, X., 2015. Effects of probiotics, oligosaccharides, and berberine combinations on growth performance of pigs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 39, 637–642.
- Fang, Z., Liu, W., Shi, P., Zhang, Y., Huang, Z., 2016. Protective effect of berberine on the intestinal caecum in chicks with *Eimeria tenella*. *Avian Biology Research* 9, 235–239.
- Feng, A.-W., Gao, W., Zhou, G.-R., Yu, R., Li, N., Huang, X.-L., Li, Q.-R., Li, J.-S., 2012. Berberine ameliorates COX-2 expression in rat small intestinal mucosa partially through PPAR γ pathway during acute endotoxemia. *International Immunopharmacology* 12, 182–188.
- Feng, R., Qu, J., Zhou, W., Wei, Q., Yin, Z., Du, Y., Yan, K., Wu, Z., Jia, R., Li, L., et al., 2016. Antibacterial activity and mechanism of berberine on avian *Pasteurella multocida*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*.
- Feng, R., Shou, J.-W., Zhao, Z.-X., He, C.-Y., Ma, C., Huang, M., Fu, J., Tan, X.-S., Li, X.-Y., Wen, B.-Y., et al., 2015. Transforming berberine into its intestine-absorbable form by the gut microbiota. *Scientific Reports* 5, 12155.
- Feng, R., Zhao, Z.-X., Ma, S.-R., Guo, F., Wang, Y., Jiang, J.-D., 2018. Gut Microbiota-Regulated Pharmacokinetics of Berberine and Active Metabolites in Beagle Dogs After Oral Administration. *Frontiers in Pharmacology* 9, 214.
- Feng, Y., Li, Y., Chen, C., Lin, X., Yang, Y., Cai, H., Lv, Z., Cao, M., Li, K., Xu, J., et al., 2013. Inhibiting Roles of Berberine in Gut Movement of Rodents are Related to Activation of the Endogenous Opioid System. *Phytotherapy Research* 27, 1564–1571.
- Fernandez, C.P., Afrin, F., Flores, R.A., Kim, W.H., Jeong, J., Kim, S., Chang, H.H., Lillehoj, H.S., Min, W., 2017. Downregulation of inflammatory cytokines by berberine attenuates *Riemerella anatipestifer* infection in ducks. *Developmental and Comparative Immunology* 77, 121–127.
- Fernandez, C.P., Kim, W.H., Diaz, J.A.R., Jeong, J., Afrin, F., Kim, S., Jang, H.-K., Lee, B.-H., Yim, D., Lillehoj, H.S., et al., 2016. Upregulation of duck interleukin-17A during *Riemerella anatipestifer* infection. *Developmental and Comparative Immunology* 63, 36–46.
- Fink-Gremmels, J., 2008. Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation processes in veterinary sciences. *European Journal of Pharmacology* 585, 502–509.
- Foster, S., Duke, J.A., 1990. *A Field Guide to Medicinal Plants: Eastern and Central North America*. Houghton Mifflin Company, Boston.
- Freile, M.L., Giannini, F., Pucci, G., Sturniolo, A., Rodero, L., Pucci, O., Balzaret, V., Enriz, R.D., 2003. Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. *Fitoterapia* 74, 702–705.
- Fu, K., Lv, X., Li, W., Wang, Y., Li, H., Tian, W., Cao, R., 2015. Berberine hydrochloride attenuates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice by suppressing activation of NF- κ B signal pathway. *International Immunopharmacology* 24, 128–132.
- Gu, L., Li, N., Gong, J., Li, Q., Zhu, W., Li, J., 2011. Berberine Ameliorates Intestinal Epithelial Tight-Junction Damage and Down-regulates Myosin Light Chain Kinase Pathways in a Mouse Model of Endotoxemia. *Journal of Infectious Diseases* 203, 1602–1612.
- Gu, S., Pei, J., 2017. Innovating Chinese herbal medicine: From traditional health practice to scientific drug discovery. *Frontiers in Pharmacology* 8, 381.
- Guo, Y., Chen, Y., Tan, Z.-R., Klaassen, C.D., Zhou, H.-H., 2012. Repeated administration of berberine inhibits cytochromes P450 in humans. *European Journal of Clinical Pharmacology* 68, 213–217.
- Guo, Y., Li, F., Ma, X., Cheng, X., Zhou, H., Klaassen, C.D., 2011a. CYP2D plays a major role in berberine metabolism in liver of mice and humans. *Xenobiotica* 41, 996–1005.
- Guo, Y., Pope, C., Cheng, X., Zhou, H., Klaassen, C.D., 2011b. Dose-response of berberine on hepatic cytochromes P450 mRNA expression and activities in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 111–118.
- Habtemariam, S., 2016. Berberine and inflammatory bowel disease: A concise review. *Pharmacological Research* 113, 592–599.
- He, Y., Yuan, X., Zhou, G., Feng, A., 2018a. Activation of IGF-1/IGFBP-3 signaling by berberine improves intestinal mucosal barrier of rats with acute endotoxemia. *Fitoterapia* 124, 200–205.
- He, Y., Yuan, X., Zuo, H., Li, X., Sun, Y., Feng, A., 2019. Berberine induces ZIP14 expression and modulates zinc redistribution to protect intestinal mucosal barrier during polymicrobial sepsis. *Life Sciences* 233, 116697.
- He, Y., Yuan, X., Zuo, H., Sun, Y., Feng, A., 2018b. Berberine Exerts a Protective Effect on Gut-Vascular Barrier via the Modulation of the Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway during Sepsis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49, 1342–1351.

- Hou, Q., Zhu, S., Zhang, C., Huang, Y., Guo, Y., Li, P., Chen, X., Wen, Y., Han, Q., Liu, F., 2019. Berberine improves intestinal epithelial tight junctions by upregulating A20 expression in IBS-D mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 118, 109206.
- Hsieh, P.C., Siegel, S.A., Rogers, B., Davis, D., Lewis, K., 1998. Bacteria lacking a multidrug pump: A sensitive tool for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6602–6606.
- Hu, S., Chen, C.-W., Chen, S.-T., Tsui, K.-H., Tang, T.-K., Cheng, H.-T., Hwang, G.-S., Yu, J.-W., Li, Y.-C., Wang, P.S., et al., 2019. Inhibitory effect of berberine on interleukin-2 secretion from PHA-treated lymphocytic Jurkat cells. *International Immunopharmacology* 66, 267–273.
- Hu, S.X., 2013. Effect of age on hepatic cytochrome P450 of Ross 708 broiler chickens. *Poultry Science*.
- Huang, C.-H., Huang, Z.-W., Ho, F.-M., Chan, W.-H., 2018. Berberine impairs embryonic development in vitro and in vivo through oxidative stress-mediated apoptotic processes. *Environmental Toxicology* 33, 280–294.
- Hung, T.-C., Jassey, A., Liu, C.-H., Lin, C.-J., Lin, C.-C., Wong, S.H., Wang, J.Y., Yen, M.-H., Lin, L.-T., 2019. Berberine inhibits hepatitis C virus entry by targeting the viral E2 glycoprotein. *Phytomedicine* 53, 62–69.
- Imenshahidi, M., Hosseinzadeh, H., 2016. *Berberis Vulgaris* and Berberine: An Update Review. *Phytotherapy Research* 30, 1745–1764.
- Jahnke, G.D., Price, C.J., Marr, M.C., Myers, C.B., George, J.D., 2006. Developmental Toxicity Evaluation of Berberine in Rats and Mice. *Birth Defects Research (Part B)* 77, 195–206.
- James, S., 1980. Thiamine uptake in isolated schizonts of *Eimeria tenella* and the inhibitory effects of amprolium. *Parasitology* 80, 313–322.
- Jeong, H.W., Hsu, K.C., Lee, J.W., Ham, M., Huh, J.Y., Shin, H.J., Kim, W.S., Kim, J.B., 2009. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 296, E955–E964.
- Jin, J.-L., Hua, G.-Q., Meng, Z., Gao, P.-J., 2010. Antibacterial Mechanisms of Berberine and Reasons for Little Resistance of Bacteria. *Chinese Herbal Medicines* 3, 27–35.
- Jing, W., Safarpour, Y., Zhang, T., Guo, P., Chen, G., Wu, X., Fu, Q., Wang, Y., 2018. Berberine Upregulates P-Glycoprotein in Human Caco-2 Cells and in an Experimental Model of Colitis in the Rat via Activation of Nrf2-Dependent Mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 366, 332–340.
- Kaldhusdal, M., Jordan, F.T.W., 2008. Clostridia, in: *Poultry Diseases*. Elsevier Ltd, Philadelphia, pp. 200–214.
- Kametani, T., 1969. Protoberberine alkaloids, in: *The Chemistry of The Isoquinoline Alkaloids*. Elsevier, Amsterdam, pp. 109–128.
- Kamrani Rad, S.Z., Rameshrad, M., Hosseinzadeh, H., 2017. Toxicology effects of *Berberis vulgaris* (Barberry) and its active constituent, berberine: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 20, 516–529.
- Kanauchi, O., Fukuda, M., Matsumoto, Y., Ishii, S., Ozawa, T., Shimizu, M., Mitsuyama, K., Andoh, A., 2006. *Eubacterium limosum* ameliorates experimental colitis and metabolite of microbe attenuates colonic inflammatory action with increase of mucosal integrity. *World Journal of Gastroenterology* 12, 1071–1077.
- Kaneda, Y., Torii, M., Tanaka, T., Aikawa, M., 1991. In vitro effects of berberine sulphate on the growth and structure of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 85, 417–425.
- Kang, S., Li, Z., Yin, Z., Jia, R., Song, X., Li, L., Chen, Z., Peng, L., Qu, J., Hu, Z., et al., 2015. The antibacterial mechanism of berberine against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 29, 2203–2206.
- Karaosmanoglu, K., Sayar, N.A., Kurnaz, I.A., Akbulut, B.S., 2014. Assessment of Berberine as a Multi-target Antimicrobial: A multi-omics Study for Drug Discovery and Repositioning. *OMICS A Journal of Integrative Biology* 18, 42–53.
- Kawano, M., Takagi, R., Kaneko, A., Matsushita, S., 2015. Berberine is a dopamine D1- and D2-like receptor antagonist and ameliorates experimentally induced colitis by suppressing innate and adaptive immune responses. *Journal of Neuroimmunology* 289, 43–55.
- Kheir, M.M., Wang, Y., Hua, L., Hu, J., Li, L., Lei, F., Du, L., 2010. Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1105–1110.
- Kim, H.-Y., Shin, H.-S., Park, H., Kim, Y.-C., Gab, Y., Park, S., Shin, H.-J., Kim, K., 2008. In vitro inhibition of coronavirus replications by the traditionally used medicinal herbal extracts, *Cimicifuga rhizoma*, *Melaleuca cortex*, *Coptidis rhizoma*, and *Phellodendron cortex*. *Journal of Clinical Virology* 41, 122–128.
- Kim, H.J., Kim, H., Jung, M.H., Kwon, Y.K., Kim, B.J., 2016. Berberine induces pacemaker potential inhibition via cGMP-dependent ATP-sensitive K⁺ channels by stimulating mu/delta opioid receptors in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine. *Molecular Medicine Reports* 14, 3985–3991.
- Kim, M.H., Kim, H., 2017. The Roles of Glutamine in the Intestine and Its Implication in Intestinal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1051.

- Kim, S.-H., Shin, D.-S., Oh, M.-N., Chung, S.-C., Lee, J.-S., Oh, K.-B., 2004. Inhibition of the Bacterial Surface Protein Anchoring Transpeptidase Sortase by Isoquinoline Alkaloids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68, 421–424.
- Kirtikar, K.R., Basu, B.D., 1998. *Indian Medicinal Plants*, Vol 1. CSIR publication, Allahabad.
- Kulkarni, S.K., Dandiya, P.C., Varandani, N.L., 1972. Pharmacological investigations of berberine sulphate. *The Japanese Journal of Pharmacology* 22, 11–16.
- Kuo, C.-L., Chi, C.-W., Liu, T.-Y., 2004. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 203, 127–137.
- Küpel, E., Koşar, M., Yeşilada, E., Başer, K.H.C., Başer, C., 2002. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sciences* 72, 645–657.
- Lan, J., Zhao, Y., Dong, F., Yan, Z., Zheng, W., Fan, J., Sun, G., 2015. Meta-analysis of the effect and safety of berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus, hyperlipemia and hypertension. *Journal of Ethnopharmacology* 161, 69–81.
- Lee, D., Bae, J., Kim, Y.K., Gil, M., Lee, J.-Y., Park, C.-S., Lee, K.J., 2013. Inhibitory effects of berberine on lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and the high-mobility group box 1 release in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431, 506–511.
- Lee, I.-A., Hyun, Y.-J., Kim, D.-H., 2010. Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF- κ B activation. *European Journal of Pharmacology* 648, 162–170.
- Li, C., Ai, G., Wang, Y., Lu, Q., Luo, C., Tan, L., Lin, G., Liu, Y., Li, Y., Zeng, H., et al., 2020. Oxyberberine, a novel gut microbiota-mediated metabolite of berberine, possesses superior anti-colitis effect: Impact on intestinal epithelial barrier, gut microbiota profile and TLR4-MyD88-NF- κ B pathway. *Pharmacological Research* 152, 104603.
- Li, C., Xi, Y., Li, S., Zhao, Q., Cheng, W., Wang, Z., Zhong, J., Niu, X., Chen, G., 2015. Berberine ameliorates TNBS induced colitis by inhibiting inflammatory responses and Th1/Th17 differentiation. *Molecular Immunology* 67, 444–454.
- Li, G.X., Wang, X.M., Jiang, T., Gong, J.F., Niu, L.Y., Li, N., 2014. Berberine prevents damage to the intestinal mucosal barrier during early phase of sepsis in rat through mechanisms independent of the NOD-like receptors signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* 730, 1–7.
- Li, H.-M., Wang, Y.-Y., Wang, H.-D., Cao, W.-J., Yu, X.-H., Lu, D.-X., Qi, R.-B., Hu, C.-F., Yan, Y.-X., 2011a. Berberine protects against lipopolysaccharide-induced intestinal injury in mice via α 2 adrenoceptor-independent mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica* 32, 1364–1372.
- Li, M., van Esch, B.C.A.M., Wagenaar, G.T.M., Garssen, J., Folkerts, G., Henricks, P.A.J., 2018. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* 831, 52–59.
- Li, Y., Ren, G., Wang, Y.-X., Kong, W.-J., Yang, P., Wang, Y.-M., Li, Y.-H., Yi, H., Li, Z.-R., Song, D.-Q., et al., 2011b. Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes. *Journal of Translational Medicine* 9, 62.
- Li, Z., Wei, Y., Chu, T., Wang, X., Liu, X., Wang, Y., Hu, S., 2005. Radioiodination, biodistribution and pharmacokinetics of berberine in mice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 265, 355–359.
- Lima, A.A.M., Fonteles, M.C., 2014. From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 47, 179–191.
- Lin, J., Cai, Q., Liang, B., Wu, L., Zhuang, Y., He, Y., Lin, W., 2019. Berberine, a Traditional Chinese Medicine, Reduces Inflammation in Adipose Tissue, Polarizes M2 Macrophages, and Increases Energy Expenditure in Mice Fed a High-Fat Diet. *Medical Science Monitor* 25, 87–97.
- Ling, X., Xiang, Y., Chen, F., Tang, Q., Zhang, W., Tan, X., 2018. Intestinal absorption differences of major bioactive compounds of Gegenqinlian Decoction between normal and bacterial diarrheal mini-pigs in vitro and in situ. *Journal of Chromatography B* 1083, 93–101.
- Liu, C.-S., Liang, X., Wei, X.-H., Jin, Z., Chen, F.-L., Tang, Q.-F., Tan, X.-M., 2019a. Gegen Qinlian decoction Treats Diarrhea in Piglets by Modulating Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids. *Frontiers in Microbiology* 10, 1–11.
- Liu, C.-S., Liang, X., Wei, X., Chen, F., Tang, Q., Tan, X., 2019b. Comparative metabolism of the eight main bioactive ingredients of gegen qinlian decoction by the intestinal flora of diarrhoeal and healthy piglets. *Biomedical Chromatography* 33, e4421.
- Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C., Duan, J., 2015. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 60, 421–430.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2, 17023.

- Liu, X., Liu, F., Ma, Y., Li, H., Ju, X., Xu, J., 2019c. Effect of Puerarin, Baicalin and Berberine Hydrochloride on the Regulation of IPEC-J2 Cells Infected with Enterotoxigenic Escherichia coli. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2019, 7438593.
- Liu, Y.-T., Hao, H.-P., Xie, H.-G., Lai, L., Wang, Q., Liu, C.-X., Wang, G.-J., 2010. Extensive intestinal first-pass elimination and predominant hepatic distribution of berberine explain its low plasma levels in rats. Drug Metabolism and Disposition 38, 1779–1784.
- Liu, Y., Hao, H., Xie, H., Lv, H., Liu, C., Wang, G., 2009. Oxidative demethylation and subsequent glucuronidation are the major metabolic pathways of berberine in rats. Journal of Pharmaceutical Sciences 98, 4391–4401.
- Liu, Y., Liu, X., Hua, W., Wei, Q., Fang, X., Zhao, Z., Ge, C., Liu, C., Chen, C., Tao, Y., et al., 2018. Berberine inhibits macrophage M1 polarization via AKT1/SOCS1/NF- κ B signaling pathway to protect against DSS-induced colitis. International Immunopharmacology 57, 121–131.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine 42, 145–151.
- Lv, Z., Peng, G., Liu, W., Xu, H., Su, J., 2015. Berberine Blocks the Relapse of Clostridium difficile Infection in C57BL/6 Mice after Standard Vancomycin Treatment. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59, 3726–3735.
- Ma, J.-Y., Feng, R., Tan, X.-S., Ma, C., Shou, J.-W., Fu, J., Huang, M., He, C.-Y., Chen, S.-N., Zhao, Z.-X., et al., 2013. Excretion of berberine and its metabolites in oral administration in rats. Journal of Pharmaceutical Sciences 102, 4181–4192.
- Maeng, H.-J., Yoo, H.-J., Kim, I.-W., Song, I.-S., Chung, S.-J., Shim, C.-K., 2002. P-glycoprotein-mediated transport of berberine across Caco-2 cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences 91, 2614–2621.
- Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A., Chadwick, L.R., 2003. In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to isoquinoline alkaloids from Sanguinaria canadensis and Hydrastis canadensis. Phytotherapy Research 17, 217–221.
- Mahmoudi, M., Zamani Taghizadeh Rabe, S., Balali-Mood, M., Karimi, G., Memar, B., Rahnama, M., Tabasi, N., Khazaee, M., Riahi-Zanjani, B., 2016. Immunotoxicity induced in mice by subacute exposure to berberine. Journal of Immunotoxicology 13, 255–262.
- Maldonado-Contreras, A.L., McCormick, B.A., 2011. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. Cell and Tissue Research 343, 5–12.
- Malik, T.A., Kamili, A.N., Chishti, M.Z., Ahad, S., Tantry, M.A., Hussain, P.R., Johri, R.K., 2017. Breaking the resistance of Escherichia coli: Antimicrobial activity of Berberis lycium Royle. Microbial Pathogenesis 102, 12–20.
- Malik, T.A., Kamili, A.N., Chishti, M.Z., Tanveer, S., Ahad, S., Johri, R.K., 2016. Synergistic approach for treatment of chicken coccidiosis using berberine - A plant natural product. Microbial Pathogenesis 93, 56–62.
- Malik, T.A., Kamili, A.N., Chishti, M.Z., Tanveer, S., Ahad, S., Johri, R.K., 2014. In vivo anticoccidial activity of berberine [18, 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo(g)-1,3-benzodioxolo(5,6-a) quinolizinium] - An isoquinoline alkaloid present in the root bark of Berberis lycium. Phytomedicine 21, 663–669.
- Marchant, D., Singhera, G.K., Utokaparch, S., Hackett, T.L., Boyd, J.H., Luo, Z., Si, X., Dorscheid, D.R., McManus, B.M., Hegele, R.G., 2010. Toll-Like Receptor 4-Mediated Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Determinant of Respiratory Virus Entry and Tropism. Journal of Virology 84, 11359–11373.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M., Schneewind, O., 2003. Passage of Heme-iron Across the Envelope of Staphylococcus aureus. Science 299, 906–909.
- Mikage, M., Mouri, C., 1999. Pharmacognostical studies of Berberis plants (Berberida+ceae) from Nepal (1) altitudinal, interspecific, and partial variations of berberine content in the bark. Natural Medicines 53, 249–254.
- Mireles, A.J., Kim, S.M., Klasing, K.C., 2005. An Acute Inflammatory Response Alters Bone Homeostasis, Body Composition, and the Humoral Immune Response of Broiler Chickens. Poultry Science 84, 553–560.
- Mo, C., Wang, L., Zhang, J., Numazawa, S., Tang, H., Tang, X., Han, X., Li, J., Yang, M., Wang, Z., et al., 2014. The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of Berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. Antioxidants and Redox Signaling 20, 574–588.
- Moghaddam, V.K., Elahi, M.Y., Nasri, M.H.F., Elghandour, M.M.M.Y., Monroy, J.C., Salem, Z.M.A., Karami, M., Mlambo, V., 2019. Growth performance and carcass characteristics of finishing male lambs fed barberry pomace-containing diets. Animal Biotechnology DOI: 10.1080/10495398.2019.1674861.
- More, S.J., 2020. European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. Irish Veterinary Journal 73.
- National Toxicology Program, 2010. Toxicology and carcinogenesis studies of goldenseal root powder (Hydrastis Canadensis) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). National Toxicology Program technical report series 562, 1–188.

- Neag, M.A., Mocan, A., Echeverría, J., Pop, R.M., Bocsan, C.I., Crisan, G., Buzoianu, A.D., 2018. Berberine: Botanical Occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular, metabolic, hepatic, and renal disorders. *Frontiers in Pharmacology* 9, 557.
- Nies, A.T., Herrmann, E., Brom, M., Keppler, D., 2008. Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 376, 449–461.
- O'Neill, J., 2016. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial resistance, Review on Antimicrobial Resistance.
- O'Shea, J.J., Steward-Tharp, S.M., Laurence, A., Watford, W.T., Wei, L., Adamson, A.S., Fan, S., 2009. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes and Infection* 11, 599–611.
- Oh, K.B., Oh, M.-N., Kim, J.-G., Shin, D.-S., Shin, J., 2006. Inhibition of sortase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to fibronectin via fibronectin-binding protein by sortase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 102–106.
- Pan, G.-Y., Wang, G.-J., Liu, X.-D., Fawcett, J.P., Xie, Y.-Y., 2002. The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacology and Toxicology* 91, 193–197.
- Peng, L., Kang, S., Yin, Z., Jia, R., Song, X., Li, L., Li, Z., Zou, Y., Liang, X., Li, L., et al., 2015. Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, 5217–5223.
- Qi, H., Wang, P., Liu, C., Li, M., Wang, S., Huang, Y., Wang, F., 2011. Involvement of HIF-1 α in MLCK-dependent Endothelial Barrier Dysfunction in Hypoxia. *Cellular Physiology and Biochemistry* 27, 251–262.
- Qin, X., Guo, B.T., Wan, B., Fang, L., Lu, L., Wu, L., Zang, Y.Q., Zhang, J.Z., 2010. Regulation of Th1 and Th17 Cell Differentiation and Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Product Compound Berberine. *The Journal of Immunology* 185, 1855–1863.
- Qiu, F., Zhu, Z., Kang, N., Piao, S., Qin, G., Yao, X., 2008. Isolation and identification of urinary metabolites of berberine in rats and humans. *Drug Metabolism and Disposition* 36, 2159–2165.
- Qiu, W., Jiang, X.H., Liu, C.X., Ju, Y., Jin, J.X., 2009. Effect of Berberine on the Pharmacokinetics of Substrates of CYP3A and P-gp. *Phytotherapy Research* 23, 1553–1558.
- Rabbani, G.H., Butler, T., Knight, J., Sanyal, S.C., Khorshed, A., 1987. Randomized Controlled Trial of Berberine Sulfate Therapy for Diarrhea Due to Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *The Journal of Infectious Diseases* 155, 979–984.
- Rajaian, H., Jalae, J., Aghajani, A., 2006. *Berberis vulgaris* as growth promoter in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 5, 395–397.
- Rallabhandi, P., Phillips, R.L., Boukhvalova, M.S., Pletneva, L.M., Shirey, K.A., Giannini, T.L., Weiss, J.P., Chow, J.C., Hawkins, L.D., Vogel, S.N., et al., 2012. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein-Induced Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signaling Is Inhibited by the TLR4 Antagonists *Rhodobacter sphaeroides* Lipopolysaccharide and Eritoran (E5564) and Requires Direct Interaction with MD-2. *mBio* 3, e00218-12.
- Rashmi, Rajasekaran, A., Rekha, P., Singh, Y.P., 2009. Quantitative estimation of berberine in roots of different provenances of *Berberis aristata* DC by HPLC and study of their antifungal properties. *Pharmacognosy Magazine* 5, 355–358.
- Roberts, M.F., 1998. Enzymology of Alkaloid Biosynthesis, in: *Alkaloids*. Plenum Press, New York, USA, pp. 109–146.
- Sack, R.B., Froehlich, J.L., 1982. Berberine inhibits intestinal secretory response of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins. *Infection and Immunity* 35, 471–475.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 163–189.
- Schultheiss, G., Diener, M., 1998. K⁺ and Cl⁻ Conductances in the Distal Colon of the Rat. *General Pharmacology: The Vascular System* 31, 337–342.
- Shanbhag, S.M., Kulkarni, H.J., Gaitonde, B.B., 1970. Pharmacological actions of berberine on the central nervous system. *The Japanese Journal of Pharmacology* 20, 482–487.
- Shen, Y.B., Piao, X.S., Kim, S.W., Wang, L., Liu, P., 2010. The effects of berberine on the magnitude of the acute inflammatory response induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in broiler chickens. *Poultry Science* 89, 13–19.
- Shi, C., Li, M., Muhammad, I., Ma, X., Chang, Y., Li, R., Li, C., He, J., Liu, F., 2018. Combination of berberine and ciprofloxacin reduces multi-resistant *Salmonella* strain biofilm formation by depressing mRNA expressions of luxS, rpoE, and ompR. *Journal of Veterinary Science* 19, 808–816.
- Shin, H.-B., Choi, M.-S., Yi, C.-M., Lee, J., Kim, N.-J., Inn, K.-S., 2015. Inhibition of respiratory syncytial virus replication and virus-induced p38 kinase activity by berberine. *International Immunopharmacology* 27, 65–68.
- Singh, N., Sharma, B., 2018. Toxicological Effects of Berberine and Sanguinarine. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5, 21.

- Spinozzi, S., Colliva, C., Camborata, C., Roberti, M., Ianni, C., Neri, F., Calvarese, C., Lisotti, A., Mazzella, G., Roda, A., 2014. Berberine and its metabolites: Relationship between physicochemical properties and plasma levels after administration to human subjects. *Journal of Natural Products* 77, 766–772.
- Srivastava, S.K., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S., 2004. Pharmacognostic evaluation of the root of *Berberis asiatica*. *Pharmaceutical Biology* 42, 467–473.
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P.W., Brooks, H.B., Radding, J.A., McGee, J., Weidner, J., 2004. Mechanism of Action Assays for Enzymes, Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Sun, D., Abraham, S.N., Beachey, E.H., 1988. Influence of Berberine Sulfate on Synthesis and Expression of Pap Fimbrial adhesion in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32, 1274–1277.
- Sun, T., Li, X.-D., Hong, J., Liu, C., Zhang, X.-L., Zheng, J.-P., Xu, Y.-J., Ou, Z.-Y., Zheng, J.-L., Yu, D.-J., 2019. Inhibitory Effect of Two Traditional Chinese Medicine Monomers, Berberine and Matrine, on the Quorum Sensing System of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 10, 2584.
- Swabb, E.A., Tai, Y.H., Jordan, L., 1981. Reversal of cholera toxin-induced secretion in rat ileum by luminal berberine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 4, G248–G252.
- Takaki, M., 2003. Gut Pacemaker Cells: the Interstitial Cells of Cajal (ICC). *Journal of Smooth Muscle Research* 39, 137–161.
- Tan, X.-S., Ma, J.-Y., Feng, R., Ma, C., Chen, W.-J., Sun, Y.-P., Fu, J., Huang, M., He, C.-Y., Shou, J.-W., et al., 2013. Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats. *PloS one* 8, e77969.
- Tizard, I.R., 2012a. Innate Immunity: The Recognition of Invaders, in: *Veterinary Immunology*. Elsevier, St. Louis, pp. 11–20.
- Tizard, I.R., 2012b. Innate Immunity: Proinflammatory and Antimicrobial Mediators, in: *Veterinary Immunology*. Elsevier, St. Louis, pp. 21–29.
- Tizard, I.R., 2012c. Cell signalling: Cytokines and Their Receptors, in: *Veterinary Immunology*. Elsevier, St. Louis, pp. 74–83.
- Tizard, I.R., 2012d. Innate Immunity: Macrophages and Recovery from Inflammation, in: *Veterinary Immunology*. Elsevier, St. Louis, pp. 41–51.
- Tizard, I.R., 2012e. Helper T cells and Their Response to Antigen, in: *Veterinary Immunology*. Elsevier, St. Louis, pp. 137–149.
- Trees, A.J., 2008. Parasitic diseases, in: *Poultry Diseases*. Elsevier Ltd, Philadelphia, pp. 444–467.
- Tsai, P.-L., Tsai, T.-H., 2004. Hepatobiliary excretion of berberine. *Drug Metabolism and Disposition* 32, 405–412.
- Tummaruk, P., Tantilertcharoen, R., Prapasarakul, N., 2009. The use of herbal medicine as an alternative antimicrobial in the feed of post-weaning piglets: a field trial. *Journal of Applied Animal Science* 2, 23–31.
- Turova, A.D., Leskov, A.I., Bichevina, V.I., 1962. Berberine, in: *Lekarstvennye Sredstva Iz Rastenii*. Moskou, pp. 303–306.
- US Food and Drug Administration, 2016. Timeline of FDA Action on Antimicrobial Resistance [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/animal-veterinary/antimicrobial-resistance/timeline-fda-action-antimicrobial-resistance> (accessed 5.9.20).
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 5649–5654.
- Venegas, D.P., De La Fuente, M.K., Landskron, G., González, M.J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N., Hermoso, M.A., 2019. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*.
- Versteegh, C.P.C., Sosef, M.S.M., 2007. Revision of the African genus *Annickia* (Annonaceae). *Systematics and Geography of Plants* 77, 91–118.
- Wang, C., Perumalla, S.R., Lu, R., Fang, J., Sun, C.C., 2016. Sweet Berberine. *Crystal Growth and Design* 16, 933–939.
- Wang, H., Li, K., Ma, L., Wu, S., Hu, J., Yan, H., Jiang, J., Li, Y., 2017a. Berberine inhibits enterovirus 71 replication by downregulating the MEK/ERK signaling pathway and autophagy. *Virology Journal* 14, 2.
- Wang, K., Feng, X., Chai, L., Cao, S., Qiu, F., 2017b. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metabolism Reviews* 49, 139–157.
- Wang, X., Feng, S., Ding, N., He, Y., Li, C., Li, M., Ding, X., Ding, H., Li, J., Wu, J., et al., 2018. Anti-inflammatory effects of berberine hydrochloride in an LPS-induced murine model of mastitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018, 5164314.
- Wang, X., He, X., Zhang, C.-F., Guo, C.-R., Wang, C.-Z., Yuan, C.-S., 2017c. Anti-arthritis effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 89, 887–893.
- Wang, X., Yao, X., Zhu, Z., Tang, T., Dai, K., Sadovskaya, I., Flahaut, S., Jabbouri, S., 2009. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34, 60–66.

- Wang, Y., Shou, J.W., Li, X.-Y., Zhao, Z.-X., Fu, J., He, C.-Y., Feng, R., Ma, C., Wen, B.-Y., Guo, F., et al., 2017d. Berberine-induced bioactive metabolites of the gut microbiota improve energy metabolism. *Metabolism: Clinical and Experimental* 70, 72–84.
- Wencai, W., Dezhi, F., Liangqian, L., Bartholomew, B., Brach, A.R., Dutton, B.E., Gilbert, M.G., Kadota, Y., Robinson, O.R., Tamura, M., et al., 2001. Ranunculaceae, in: *Flora of China*. Vol. 6 (Caryophyllaceae through Lardizabalaceae). Science press, Missouri Botanical Garden Press, Beijing, St. Louis, pp. 133–438.
- Wojtyczka, R., Dziedzic, A., Kępa, M., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Mularz, T., Idzik, D., 2014. Berberine Enhances the Antibacterial Activity of Selected Antibiotics against Coagulase-Negative Staphylococcus Strains in Vitro. *Molecules* 19, 6583–6596.
- Wu, L.T., Tsou, M.-F., Ho, C.-C., Chuang, J.-Y., Kuo, H.-M., Chung, J.-G., 2005. Berberine Inhibits Arylamine N-Acetyltransferase Activity and Gene Expression in Salmonella Typhi. *Current Microbiology* 51, 255–261.
- Xu, W., Chen, D.-H., Chen, Q.-Q., Liu, W.-B., 2017. Growth performance, innate immune responses and disease resistance of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* adapted to different berberine-dietary feeding modes. *Fish and Shellfish Immunology* 68, 458–465.
- Xu, X., Yang, C., Chang, J., Wang, P., Yin, Q., Liu, C., Gao, T., Dang, X., Lu, F., 2020. Dietary Supplementation with Compound Probiotics and Berberine Alters Piglet Production Performance and Fecal Microbiota. *Animals* 10, 511.
- Yan, B., Wang, D., Dong, S., Cheng, Z., Na, L., Sang, M., Yang, H., Yang, Z., Zhang, S., Yan, Z., 2017. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF- κ B pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells. *International Immunopharmacology* 45, 194–200.
- Yan, F., Wang, L., Shi, Y., Cao, H., Liu, L., Washington, M.K., Chaturvedi, R., Israel, D.A., Cao, H., Wang, B., et al., 2012. Berberine promotes recovery of colitis and inhibits inflammatory responses in colonic macrophages and epithelial cells in DSS-treated mice 302, 504–514.
- Yan, Y.-Q., Fu, Y.-J., Wu, S., Qin, H.-Q., Zhen, X., Song, B.-M., Weng, Y.-S., Wang, P.-C., Chen, X.-Y., Jiang, Z.-Y., 2018. Anti-influenza activity of berberine improves prognosis by reducing viral replication in mice. *Phytotherapy Research* 32, 2560–2567.
- Yang, L., Liu, G., Liang, X., Wang, M., Zhu, X., Luo, Y., Shang, Y., Yang, J., Zhou, P., Gu, X.-L., 2019. Effects of berberine on the growth performance, antioxidative capacity and immune response to lipopolysaccharide challenge in broilers. *Animal Science Journal* 90, 1229–1238.
- Yang, Y., Qi, J., Wang, Q., Du, L., Zhou, Y., Yu, H., Kijlstra, A., Yang, P., 2013. Berberine suppresses Th17 and dendritic cell responses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54, 2516–2522.
- Yazdani, A., Poorbaghi, S.L., Habibi, H., Nazifi, S., Rahmani Far, F., Sepelhrimanesh, M., 2013. Dietary Berberis vulgaris extract enhances intestinal mucosa morphology in the broiler chicken (*Gallus gallus*). *Comparative Clinical Pathology* 22, 611–615.
- Yeşilada, E., Küpeli, E., 2002. Berberis crataegina DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 237–248.
- Yi, J., Ye, X., Wang, D., He, K., Yang, Y., Liu, X., Li, X., 2013. Safety evaluation of main alkaloids from *Rhizoma Coptidis*. *Journal of Ethnopharmacology* 145, 303–310.
- Yu, D.X., He, Z., Pouton, C., Hoerr, F.J., Xiao, Z., 2017a. Target Animal Safety and Residual Study for Berberine and other Phytogetic Compounds in Broiler Chickens. *Archives of Clinical Microbiology* 8, 69.
- Yu, D.X., He, Z., Wenyue, W., Pouton, C., Xiao, Z.-C., 2017b. The Effects of Berberine on Clostridium Perfringens Induced Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *Archives of Clinical Microbiology* 08, 44.
- Yu, X.-T., Xu, Y.-F., Huang, Y.-F., Qu, C., Xu, L.-Q., Su, Z.-R., Zeng, H.-F., Zheng, L., Yi, T.-G., Li, H.-L., et al., 2018. Berberine attenuates mucosal lesions and inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *PLoS ONE* 13, e0194069.
- Yue, S.J., Liu, J., Wang, W.X., Wang, A.T., Yang, X.Y., Guan, H.S., Wang, C.Y., Yan, D., 2019. Berberine treatment-emergent mild diarrhea associated with gut microbiota dysbiosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 116, 109002.
- Yuqun, L., 2011. *Traditional Chinese Medicine, Traditional Chinese Medicine*. Cambridge University Press, New York, USA.
- Zeisel, M.B., Dhawan, P., Baumert, T.F., 2019. Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. *Gut* 68, 547–561.
- Zhang, C., Shi, Y.-R., Liu, X.-R., Cao, Y.-C., Zhen, D., Jia, Z.-Y., Jiang, J.-Q., Tian, J.-H., Gao, J.-M., 2015. The Anti-Apoptotic Role of Berberine in Preimplantation Embryo In Vitro Development through Regulation of miRNA-21. *PLOS ONE* 10, e0129527.
- Zhang, D., Yang, L., Su, W., Zhao, Y., Ma, X., Zhou, H., Xu, B., Zhang, K., Ma, H., 2018. Aquaporin-4 is Downregulated in the Basolateral Membrane of Ileum Epithelial Cells during Enterotoxigenic Escherichia coli-induced Diarrhea in mice. *Frontiers in Microbiology* 8, 2655.

- Zhang, H.Y., Piao, X.S., Zhang, Q., Li, P., Yi, J.Q., Liu, J.D., Li, Q.Y., Wang, C.Q., 2013. The effects of *Forsythia suspensa* extract and berberine on growth performance, immunity, antioxidant activities, and intestinal microbiota in broilers under high stocking density. *Poultry Science* 92, 1981–1988.
- Zhang, W., Xu, J.-H., Yu, T., Chen, Q.-K., 2019a. Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 118, 109131.
- Zhang, X., Qiu, F., Jiang, J., Gao, C., Tan, Y., 2011. Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: Involvement of P-glycoprotein. *Xenobiotica* 41, 290–296.
- Zhang, Y., Guo, L., Huang, J., Sun, Y., He, F., Zloh, M., Wang, L., 2019b. Inhibitory effect of Berberine on Broiler P-glycoprotein Expression and Function: In Situ and In Vitro Studies. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1966.
- Zhang, Y., Li, X., Zhang, Q., Li, J., Ju, J., Du, N., Liu, X., Chen, X., Cheng, F., Yang, L., et al., 2014. Berberine hydrochloride prevents postsurgery intestinal adhesion and inflammation in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 349, 417–426.
- Zhang, Y., Wang, X., Sha, S., Liang, S., Zhao, L., Liu, L., Chai, N., Wang, H., Wu, K., 2012. Berberine increases the expression of NHE3 and AQP4 in sennosideA-induced diarrhoea model. *Fitoterapia* 83, 1014–1022.
- Zhao, C., Wang, Y., Yuan, X., Sun, G., Shen, B., Xu, F., Fan, G., Jin, M., Li, X., Liu, G., 2019. Berberine inhibits lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines by suppressing TLR4-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in rumen epithelial cells of Holstein calves. *Journal of Dairy Research* 86, 171–176.
- Zhao, T.-Y., Su, L.-P., Ma, C.-Y., Zhai, X.-H., Duan, Z.-J., Zhu, Y., Zhao, G., Li, C.-Y., Wang, L.-X., Yang, D., 2015. IGF-1 decreases portal vein endotoxin via regulating intestinal tight junctions and plays a role in attenuating portal hypertension of cirrhotic rats. *BMC Gastroenterology* 15, 77.
- Zhong, W., McClain, C.J., Cave, M., Kang, Y.J., Zhou, Z., 2010. The role of zinc deficiency in alcohol-induced intestinal barrier dysfunction. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 298, G625–G633.
- Zhou, J., Xie, G., Yan, X., 2011. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications Vol. 1 Isolated Compounds A-C, Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications*. Springer-Verlag, Berlin.
- Zhou, X., Yang, C., Li, Y., Liu, X., Wang, Y., 2015. Potential of berberine to enhance antimicrobial activity of commonly used antibiotics for dairy cow mastitis caused by multiple drug-resistant *Staphylococcus epidermidis* infection. *Genetics and Molecular Research* 14, 9683–9692.
- Zhu, B., Ahrens, F., 1982. Effect of Berberine on Intestinal Secretion Mediated by *Escherichia Coli* Heat-Stable Enterotoxin in Jejunum of Pigs. *American Journal of Veterinary Research* 43, 1594–1598.
- Zhu, L., Gu, P., Shen, H., 2019a. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats. *International Immunopharmacology* 68, 242–251.
- Zhu, Q., Sun, J., Peng, M., Shi, P., Song, Y., Qiao, Y., Huang, Z., 2019b. Effect of berberine on oxidative stress caused by *Eimeria tenella* in chicken. *Indian Journal of Animal Health* 58, 175–186.
- Zundler, S., Neurath, M.F., 2015. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 26, 559–568.
- Zuo, F., Nakamura, N., Akao, T., Hattori, M., 2006. Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* 34, 2064–2072.