

SPATHODEA CAMPANULATA: EEN ANTIDIABETISCH GENEESMIDDEL?

Gert LAEKEMAN

*Instituut Farmaceutische Wetenschappen KU-Leuven
Van Evenstraat 4,
B - 3000 Leuven*

**Gaspard NIYONZIMA, Simon SCHARPE, Arnold
VLIETINCK**

*Departement Farmaceutische Wetenschappen UIA
Universiteitsplein, 1,
B - 2610 Wilrijk*

Tony METS

*Faculteit Geneeskunde VUB
Laarbeeklaan, 101,
B - 1090 Brussel*

SUMMARY

*Decoctions of the stem bark of *Spathodea campanulata* (SC) are currently used in Rwanda to treat insulin- and non insulin-dependent diabetics. In order to confirm and further examine hypoglycemic activity of this plant we set up a research project with as final objective a possible standardisation of *Spathodea* in antidiabetic therapy in Rwanda.*

Up to now we were able to confirm the blood sugar lowering effect of SC in hyperglycemic mice (hyperglycemia provoked by streptozotocin = SZ). Also hyperglycemia in glucose loaded mice (glucose tolerance test = GTT) could be tempered by SC. Despite these clearcut hypoglycemic activity, no rise of insulin was seen in the SC treated mice. The activity must be due to some other mechanism of action.

The search for active principles did not lead to satisfying results up to now. We have only indirect evidence for the presence of sugar-like compounds, as SC decoctions enhance the glycemia transiently.

Some hypotheses are formulated with regard to mechanisms of action and active compounds of SC. These aspects will guide future research.

RÉSUMÉ

Des décoctés de l'écorce de **Spathodea campanulata** (SC) sont utilisés au Rwanda comme antidiabétique. Des activités thérapeutiques ont été rapportées en cas de diabète insulino- et non-insulino dépendants. Afin de pouvoir confirmer et approfondir le mécanisme de cette activité hypoglycémique nous avons conçu un projet de recherche. L'objectif final est de standardiser l'usage de *Spathodea* en thérapie antidiabétique.

Jusqu'à présent nous avons démontré un effet hypoglycémiant en traitant des souris hyperglycémiques avec des décoctés de SC (souris hyperglycémiques par streptozotocin SZ). Les décoctés abaissaient aussi les glycémies pendant les tests de tolérance de glucose. Les taux d'insuline étant inchangés, un autre mécanisme d'action doit être envisagé.

Jusqu'à maintenant la recherche des produits actifs n'a pas mené à des conclusions décisives. Nous avons des preuves indirectes de la présence de sucres dans les préparations testées, puisque ces dernières augmentent temporairement les glycémies.

Nous envisageons quelques hypothèses en ce qui concerne des mécanismes d'action et des substances chimiques hypoglycémiantes, afin de définir des objectifs de recherches futures.

KEY WORDS: diabetes; hypoglycemic activity; Rwanda; **Spathodea campanulata**

1. INLEIDING

1.1. Diabetes in Europa en Afrika

Diabetes doet zich voor onder twee gedaanten. Type I of juveniele diabetes berust op een aangeboren pancreas- of alveesklierdefect. Hierdoor heeft het patiëntje geen of onvoldoende insuline en is aangewezen op dagelijkse insuline inspuitingen. Spijts de steeds zuiverder en gebruiksvriendelijker insuline blijft het een hele klus om de natuurlijke insuline afscheiding na te bootsen.

Meestal hinken we de feiten achterna met dergelijke inspuitingen. Onregelmatige (meestal te hoge) bloedsuikerspiegels zijn er het gevolg van. Dat teveel aan suiker bindt zich met eiwitten in bloedvaten en zenuwen. Hierdoor vertonen deze weefsels vroegtijdige en ernstige verouderingsverschijnselen. Blindheid en afsterven van weefsels (in tenen of vingers bijvoorbeeld) zijn ernstige complicaties van diabetes type I (Furth, 1990).

Type II of ouderdomsdiabetes ontstaat geleidelijk. De alveesklier werkt nog wel, maar haar insulineproductie zakte naar een lager peil of de geproduceerde insuline heeft minder effect. Mogelijk speelt onze koolhydraatrijke voeding een nefaste rol in het aftakelen van de alveesklier. Type II patiënten redden het meestal met bloedsuiker-verlagende geneesmiddelen maar soms is insuline noodzakelijk (Thews et al. 1985).

Ook in Rwanda komt diabetes voor. Onder die diabetes gevallen tellen we een groot deel jongere volwassenen. Het type diabetes waar zij aan lijden is niet zo duidelijk te typeren. Vermoedelijk spelen (virale) infecties en ondervoeding een rol in het steeds slechter functioneren van de pancreas of alveesklier. De strikte toepassing van de klassieke typologie wordt nu moeilijker. Onderliggende pathologische achtergronden zijn belangrijk voor wetenschappelijke evaluatie van traditionele geneeskundige praktijken bij de behandeling van diabetes in ontwikkelingslanden (Kayihigi, 1982).

Spathodea campanulata en diabetes

Spathodea campanulata Beauv. (Bignoniaceae) (= SC) vinden we terug in Rwanda als een boom die tot 18 m hoog kan worden. De bruine, waterrijke bloemen leidden tot de naam Afrikaanse tulpenboom (Blundell, 1987). De boom

groeit ook in Indochina waar aan de bloemen een wondhelende werking wordt toegeschreven (Perry, 1980). Toch komen de meeste gegevens over traditioneel gebruik uit Afrika. Ngouela et al. (1990) vermeldt als indicaties: oedeem, darmontstekingen, verzweringen, filaria infecties, gonorree, diarree en tegengif bij vergiftigingen. Schors en bladeren hebben een aantoonbare antimalaria werking (Makinde et al. 1987; 1988; 1990).

Afkooksels van de schors zijn een gekende remedie tegen zowel insuline-afhankelijke als insuline-onafhankelijke diabetes. We konden een viertal patiënten volgen die SC afkooksels gebruikten als lavement. De patiënten waren tussen 42 en 48 jaar oud en waren in het ziekenhuis van Butare (Zuid-Rwanda) geregistreerd als diabetici sedert 4, 17, 22 en 24 maanden. Alle vier hadden ze tevergeefs glibenclamide (Euglucon^R of Daonil^R) geprobeerd. Geen enkele van de patiënten vertoonde duidelijke symptomen van ondervoeding.

Op het ogenblik van de therapiewissel naar SC hadden ze 40, 28, 20 en 40 eenheden insuline nodig per dag. Ze stopten abrupt met insuline. Gedurende enkele weken gebruikten ze dagelijks SC-lavementen. Daarna volstond één wekelijkse toediening. We volgden deze patiënten gedurende acht maanden. Twee van hen hadden een normale bloedsuikerspiegel, twee anderen hadden een lichte hyperglycemie (Laekeman et al. 1990). Op basis van de symptomatologie zouden we hogerbesproken diabetici kunnen klasseren onder type I. Het gaat hier evenwel niet om jeugdige patiënten. Insulinespiegels werden bij deze patiënten niet bepaald. Vermoedelijk hebben we te maken met een intermediair type. Alhoewel deze klinische gegevens erg onvolledig zijn trokken de gevallen onze aandacht. We namen *Spathodea campanulata* als onderzoeksobjectief.

2. DOELSTELLINGEN ONDERZOEKSPRINCIPES, MIDDELEN EN METHODEN

Met onderzoek naar de mogelijke hypoglycemische werking van *Spathodea campanulata* heeft niet op de eerste plaats de bedoeling nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen, hiervoor werken we op een te kleine schaal.

Doelstellingen zijn wel:

- (1) Het traditioneel gebruik van *Spathodea* als antidiabeticum wetenschappelijk onderbouwen.

- (2) De isolatie van actieve fracties of verbindingen uit *Spathodea*.
- (3) Het standaardiseren van *Spathodea* preparaten bestuderen met het oog op therapeutische aanwending bij diabetes.

2.1. Materiaal en bereiding van de extracten

De schors van *Spathodea campanulata* (SC) werd verzameld in en rond Butare (Zuid-Rwanda; 1600 - 1800 m boven de zeespiegel). De stukken schors werden fijngemalen tot poeder en naar België overgebracht voor verder onderzoek.

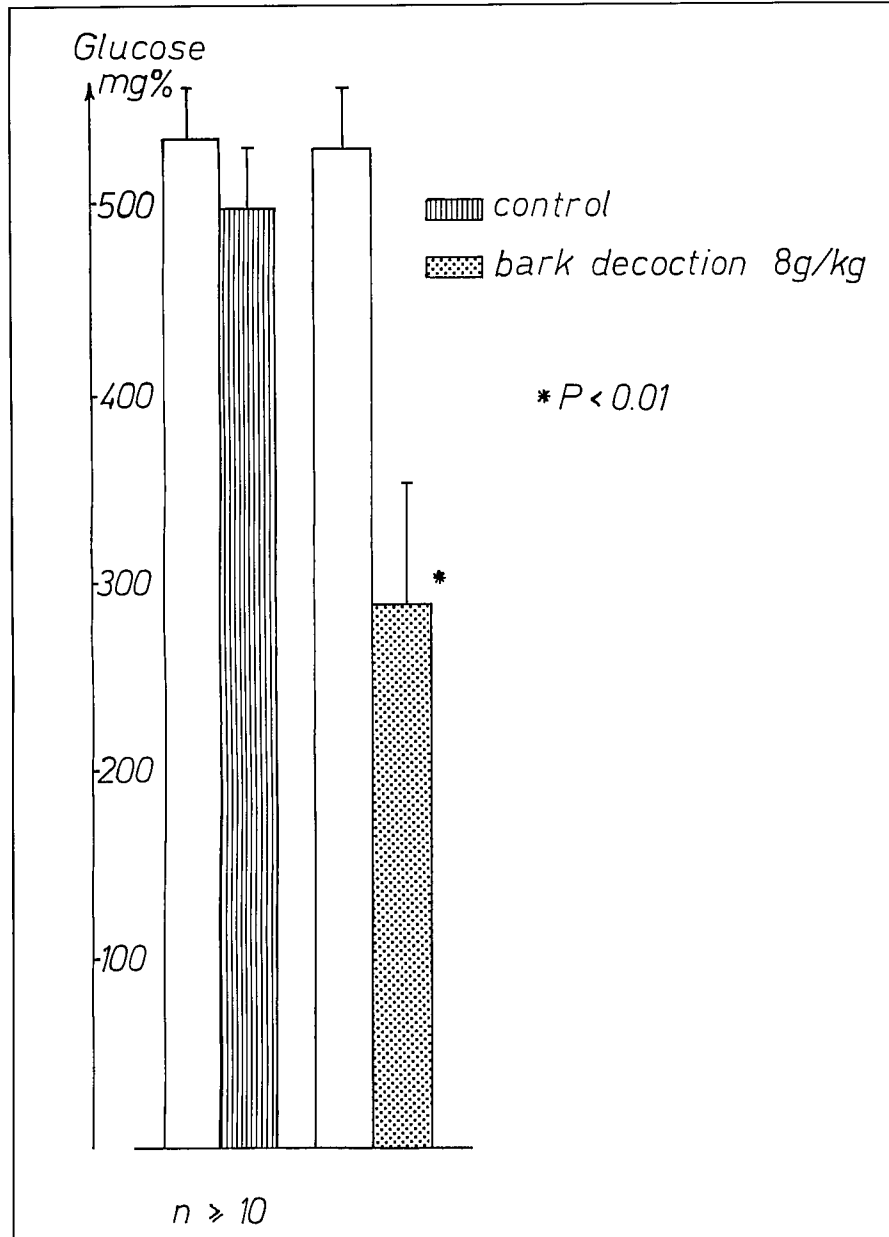
We bereidden afkooksels van SC door 20 g schorspoeder te koken met 200 ml water gedurende 15'. Na filtratie en lyofilisatie (= droogvriezen) bekwamen we een poeder dat - zoals oploskoffie - gemakkelijk in citraatbuffer (pH 4.3; 0.1 M) oploste. Deze oplossingen spoten we intraperitoneaal in bij de muizen. In alle experimenten gebruikten we een equivalent van 8 g droog schorspoeder per kg lichaamsgewicht. Het volume SC bleef beperkt tot 1/200 van het gewicht van de muis in g uitgedrukt (bijvoorbeeld 0.15 ml voor een muis van 30 g).

2.2. Streptozotocine behandelde muizen

Muizen (Swiss, vrouwelijk, 25-30g) krijgen streptozotocine (= SZ; 150 mg/kg; intraperitoneaal) ingespoten. Streptozotocine is een nitrosuiker dat de alvleesklier beschadigt: een lagere insulineproductie is er het gevolg van. Na een viertal dagen manifesteert zich een duidelijke hyperglycemie. De werking van bloedsuikerverlagende middelen kan nu onderzocht worden (Junod, 1969).

Een bloedsuikerbepaling toonde aan welke muizen diabeet waren. Wanneer de suikerspiegel boven 180 mg/100 ml uitsteeg, namen we de muizen verder in het experiment op. We stelden de bestudeerde groepen muizen zo samen dat de gemiddelde bloedsuikerwaarden van de groepen (controles en met extract behandelde dieren) zo weinig mogelijk verschilden. Er waren minstens tien muizen per groep.

Één groep hyperglycemische muizen kreeg een equivalent van 8 g droog poeder per kg lichaamsgewicht ingespoten. De andere groep of controlegroep kreeg hetzelfde volume bufferoplossing. Na 18 uur evalueerden we het effect via bloedsuiker- en insulinebepaling.



Figuur 1:

bloedsuikerverlagende werking met waterige afkooksels van **Spathodea campanulata**. Open kolommen geven het bloedsuikergehalte na inspuiting van streptozotocine (hyperglycemie). De gevulde kolommen staan voor het effect van oplosmiddel (control) of plant (bark decoction). Iedere kolom stelt het gemiddelde \pm de standaardafwijking voor van tenminste 10 experimenten. Statistische verschillen werden berekend met de niet parametrische toets van Wilcoxon.

2.3. Glucosetolerantietest

De glucose tolerantie test (GTT) baseert zich op een principe dat ook in de kliniek geldt. Normoglycemische Swiss muizen (zie streptozotocinebehandeling) werden nuchter gezet de dag voor het experiment. Zij slikten een grote hoeveelheid glucose (hier 150 mg/muis). Vier uur voor het innemen van glucose kregen de muizen Spathodea of bufferoplossing intraperitoneaal ingespoten. Bloedafnamen gebeurden voor inname van glucose, na 30, 60 en 120 minuten en na 16 uur. Per groep werden minstens zes muizen in experiment genomen (Niyonzima, 1992).

2.4. Bloedafname, glucose en insulinemeting

Via een prik in de staartvene vingen we 10 μ l bloed op in 0,5 ml hemolyserend en stabiliserend reagens (Boehringer Mannheim). Glucose dosering gebeurde in een auto-analyser (Cobas Bio, Roche) met de glucose hexokinase methode (Boehringer Mannheim) (Elfellha, 1984).

Bloed voor insuline-analyse namen we op het einde van een experiment. We verdoofden de muisjes met ether en via hartpunctie konden we 0.6 - 1 ml bloed afnemen. Na stolling (30' bij 37°C) bepaalden we insuline in het serum met een radioimmunoassay kit (Pharmacia Diagnostics, Brussels).

3. RESULTATEN

Vier dagen na een éénmalige streptozotocine inspuiting was 80% van de muisjes hyperglycemisch. Hun insulineproductie daalde tot minder dan de helft. Binnen de 18 uur na de inspuiting evalueerden we de bloedsuikerspiegels. SC deed de bloedsuikerspiegel sterk dalen ten opzichte van de controledieren (zie figuur 1). Deze daling was statistisch significant (Wilcoxon) maar leidde voor de Spathodea groep niet tot normalisering van de bloedsuikerspiegel. De buffer had geen invloed op de hyperglycemie. Gedeeltelijk gezuiverde afkooksels (butanolextracten) hadden ook een hypoglycemische werking. Zowel ongezuiverde als gezuiverde waterige extracten beïnvloedden daarentegen de insulineproductie niet.

Glucosetolerantietesten (GTT) wezen ook op een bloedsuikerverlagende werking van Spathodea (figuur 2). Hiervoor was het noodzakelijk het preparaat 4 uur vóór glucose toe te dienen. Vroegere experimenten wezen immers op een bloedsuiker-

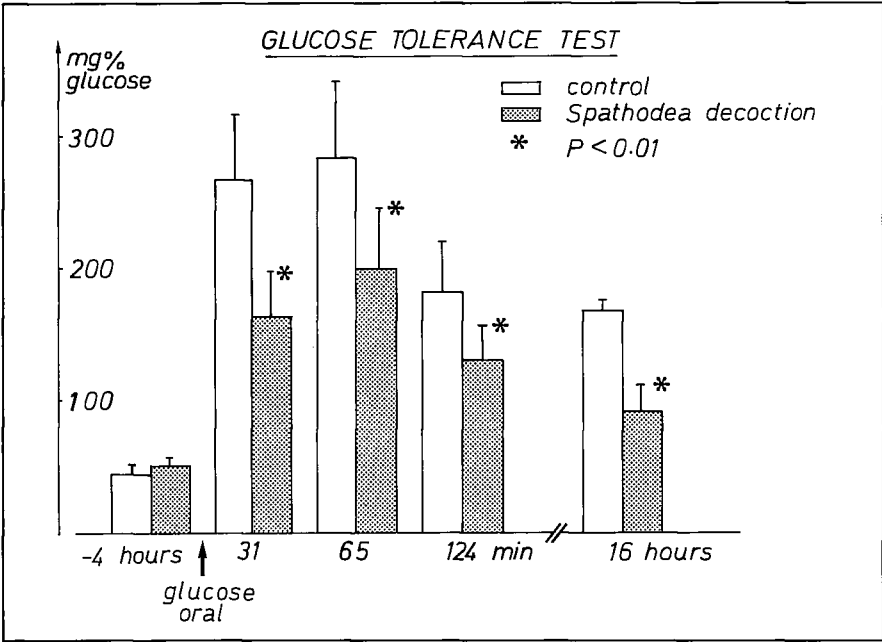
verhogende werking van Spathodea! Dit laatste wijst mogelijk op de aanwezigheid van suikers of (poly)sacchariden in de afkooksels.

De gebruikte doses van SC veroorzaakten geen verhoogde mortaliteit bij de proefdieren. De muisjes behielden hun normale levendigheid. Hyperglycemie bleek meer schade te veroorzaken. Een evidentie voor afwezigheid van toxiciteit komt ook uit Rwanda waar ons geen vergiftigingsgevallen bekend zijn bij humaan gebruik.

4. DISCUSSIE

Enkele punten kunnen hier ter discussie gesteld worden.

- (1) De effectieve dosis van Spathodea is hoog. De juiste hoeveelheid poeder-equivalent toegediend in de traditionele praktijk is ons onbekend. Waarschijnlijk varieert die van bereiding tot bereiding. De hoge dosis hoeft geen hypotheek te werpen op de waargenomen activiteit. In gelijkaardige experimenten met andere planten worden soms doses gebruikt tot 25 g/kg (Karunayake et al. 1984).
- (2) Spathodea verhoogt de insulineproductie niet wanneer die om pathologische redenen is verlaagd. Een ander werkingsmechanisme moet dus aan de basis liggen van het vastgestelde effect. Verhoging van de insuline-afscheiding is lang niet de enige manier om therapeutisch tussen te komen in geval van diabetes. We sommen hier enkele mogelijkheden op uit onderzoek met andere planten :
 - Stimulatie van het glucose metabolisme ter hoogte van:
 - * het glucose oxydase;
 - * de fosforylase activiteit;
 - * de glucose 6-fosfaat dehydrogenase;
 - * fosfofructokinase;(Suzuki & Hikino, 1989).
 - Verminderen van de glycogeenreserves in de lever (Suzuki & Hikino, 1989).
 - Verminderen van de glucose opname in het lichaam (Zarzuelo et al. 1990).



Figuur 2:

Resultaten van de glucose tolerantie test. De open kolommen geven de glucosespiegels van de dieren ingespoten met oplosmiddel (control), de gevulde kolommen deze van de met Spathodea behandelde dieren. Iedere kolom is het resultaat \pm de standaardafwijking van minstens 6 experimenten. Statistische verschillen werden berekend met de niet parametrische toets van Wilcoxon

- Verhogen van het glucoseverbruik in de perifere weefsels (Zarzuelo et al. 1990; Welihinda & Karunanayake, 1986).
- (3) De actieve bestanddelen zijn alleszins wateroplosbaar en warmtebestendig. Onze experimenten wijzen op aanwezigheid van suikers of polysuikers in de afkooksels. De isolatie van deze groep stoffen vergt speciale ervaring. In de nabije toekomst plannen we onderzoek met fracties gescheiden op basis van hun moleculair gewicht.
De literatuur maakt herhaaldelijk melding van hypoglycemiërende polysacchariden met laag moleculair gewicht (Konno et al. 1985; Hikino et al. 1985; Takahashi et al. 1986).

Verder onderzoek zal gericht zijn op :

- 1) Isolatie en zuivering van actieve fracties uit SC.
- 2) Testen van deze fracties op hun biologische activiteit. We spreken van een biologisch-geleide extractie.
- 3) Ontwikkelen van **in vitro** technieken om de activiteit van fracties te testen. Hierbij ogen we vooral naar het testen van enzymatische activiteit. Dergelijke technieken moeten het gebruik van proefdieren sterk beperken en de testcapaciteit verhogen.

Spathodea campanulata is geen alleenstaand geval. Rahman & Zaman (1989) publiceerden een lijst met 343 planten die hypoglycemisch zouden werken. Ivorra et al. (1989) bespraken 35 groepen natuurstoffen en 45 planten waaraan antidiabetische eigenschappen worden toegekend. Bever (1980) groepeerde hypoglycemisch werkzame Westafrikaanse planten volgens hun inhoudsstoffen. In geen enkel van deze overzichtsartikelen komt *Spathodea* voor. Bovendien wachten de meeste planten uit hoger geciteerde publikaties nog op verder fundamenteel en klinisch onderzoek.

Traditionele geneeskundige praktijken in de gehele wereld en in Afrika in het bijzonder openen wegen naar geneesmiddelen bruikbaar in primitieve omstandigheden. Wij willen via ons onderzoek de kennis van dit belangrijk patrimonium verhogen in het belang van de ziekte- en gezondheidszorg in Afrika. Als voorlopige conclusie geldt dat het gebruik van **Spathodea campanulata** als antidiabeticum in

Rwanda stoelt op wetenschappelijk aantoonbare feiten. Verder onderzoek met het oog op gestandaardiseerde klinische toepassing is zeker gewettigd.

REFERENTIES

- BEVER O. (1980) Oral hypoglycemic plants in West Africa. *J. Ethnopharmacol.* 2, 119-127.
- BLUNDELL M. (1987) In: Collins Guide to the wild flowers of East Africa; Collins London p. 381.
- ELFELLAH M.S., AKTHER M.H. & KHAN M.T. (1984) Anti-hyperglycemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J. Ethnopharmacol.* 11, 275-281.
- FURTH A.J. (1990) De zoete aanval; suiker in het lichaam. *Natuur & Techniek* 58, 476-485.
- HIKINO H., MIZUNO T., OSHIMA Y. & KONNO C. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of Moran A, a glycoprotein of *Morus alba* root barks. *Planta Med.* 51, 159-161.
- IVORRA M.D., PAYA M. & VILLAR A. (1989) A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *J. Ethnopharmacol.* 27, 243-275.
- JUNOD A., LAMBERT A.F., STAUFFACHER W. & RENOLD A.E. (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: a relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48, 2129-2139.
- KARUNANAYAKE E.H., WELIHINDA J., SIRIMANNE S.R. & SINNADORAI G. (1984) Oral hypoglycemic activity of some medicinal plants of Sri Lanka. *J. Ethnopharmacol.* 11, 223-231.
- KAYIHIGI J. (1982) Diabète sucré. In: Santé et maladie au Rwanda. A. Meheus, S. Butera, W. Eyllenbosch, G. Gatera, M. Kivits & I. Musafili Eds. AGCD Bruxelles pp. 527-532.
- KONNO C., MIZUNO T. & HIKINO H. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of lithospermans A, B and C, glycans of *lithospermum erythrorizon* roots. *Planta Med.* 51, 157.
- LAEKEMAN G., NIYONZYMA G., SCHARPE S., METZ T. & VLIETINCK A.J. (1990) Hypoglycemic activity of *Spathodea campanulata* (Beauv.) decoctions in mice. *Arch. intern. Pharmacodyn.* 307, 188.
- MAKINDE J.M., ADESOGAN E.K. & AMUSAN O.O.G. (1987) The schizontocidal activity of *Spathodea campanulata* leaf extract on *Plasmodium berghei* in mice. *Phytother. Res.* 1, 65.
- MAKINDE J.M., AMUSAN O.O.G. & ADESOGAN E.K. (1988) The antimalarial activity of *Spathodea campanulata* stem bark on *Plasmodium berghei* in mice. *Planta Med.* 54, 122-125.

- MAKINDE J.M., AMUSAN O.O.G. & ADESOGAN E.K. (1990) The antimalarial activity of chromatographic fractions of *Spathodea campanulata* stem bark extracts against *Plasmodium berghei* in mice. *Phytother. Res.* 4, 53-56.
- NGOUELA S., NYASSE B., TSAMO E., SONDEGAM B.L. & CONOLLY J.D. (1990) Spathodic acid: a triterpene acid from the stem bark of *Spathodea campanulata*. *Phytochemistry* 29, 3959-3961.
- NIYONZYMA G., LAEKEMAN G.M., METS T. SCHARPE S., VAN BEECK L. & VLIETINCK A.J. (1992) Hypoglycemic activity of *Spathodea campanulata* stem bark decoction in mice. Accepted for publication in *Phytotherapy Research*.
- PERRY L.M. (1980) *Medicinal plants of east and southeast Asia*; the MIT Press Cambridge p. 58.
- RAHMAN A.-U. & ZAMAN K. (1989) Medicinal plants with hypoglycemic activity. *J. Ethnopharmacol.* 26, 1-55.
- SUZUKI Y. & HIKINO H. (1989) Mechanisms of hypoglycemic activity of Panaxans A and B, glycans of *Panax ginseng* roots: effects on the key enzymes of glucose metabolism in the liver of mice. *Phytotherapy Research* 3, 15-19.
- TAKAHASHI M., KONNO C. & HIKINO H. (1986) Isolation and hypoglycemic activity of coixans A, B and C, glycans of *Coix-lachryma-jobi* var. *ma-yuen* seeds. *Planta Med.* 52, 64-65.
- THEWS G., MUTSCHLER E. & VAUPEL P. (1985) *Human Anatomy Physiology and Pathophysiology*. Elsevier, Amsterdam pp. 689-691.
- WELIHINDA J. & KARUNANAYAKE E.H. (1986) Extra-pancreatic effects of *Momordica charantia* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 17, 247-254.
- ZARZUELO A., RISCO S., GAMEZ M.J., JIMINEZ J., CAMARA M. & MARTINEZ M.A. (1990) Hypoglycemic action of *Salvia lavandulifolia* Vahl. ssp. *Oxydon*: a contribution to studies on the mechanism of action. *Life Sciences* 47, 909.