

7. Zusammenfassung

Tramadol ist ein zentral wirksames Analgetikum und besteht als racemisches Gemisch aus 50% (+)- und 50% (-) Tramadol. Es weist eine Strukturverwandtschaft zum Morphin auf (siehe Seite 1).

In vitro-Studien mehrerer Arbeitskreise beschreiben, daß sowohl Noradrenalin als auch Serotonin an der antinozizeptiven Wirkung von Tramadol beteiligt ist. Darüber hinaus ist von zentralwirksamen Opioiden (Morphin) bekannt, daß sie die dopaminerge Neurotransmission in bestimmten Bereichen des Gehirns beeinflussen. Über Auswirkungen von Tramadol auf den Neurotransmitter Dopamin war bislang nichts bekannt. Daher sollten in dieser Arbeit ex vivo-Studien bezüglich des Einflusses von Tramadol auf Dopamin (DA), Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) unternommen werden.

Männliche SPF Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 190 und 220 g sind mit den Prüfsubstanzen, sowie Morphin und Fluoxetin als Referenzsubstanzen behandelt und im Anschluß daran betäubt und guillotiniert worden. Folgende 5 Gehirnareale - frontaler und temporaler Cortex (CORTEX), Hypothalamus (HYPO), Corpus striatum (C. STRI), Medulla oblongata und Pons (M+P) und Cerebellum (CEREB) - wurden aufbereitet und die Gehalte der folgenden Neurotransmitter sowie der Hauptabbauprodukte bestimmt: Dopamin sowie seine Metabolite DOPAC, HVA und 3-MT, Noradrenalin und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) mit dem Hauptmetaboliten 5-HiAA. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC-ECD).

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

Dopamin:

1. Morphin (21,5 mg/kg i.p) führte zu einer signifikanten Erhöhung des DA-Gehaltes in den Arealen M+P und C. STRI 1-1,5 h p.a..

Die anderen untersuchten Areale HYPO und CEREB wiesen ebenfalls einen erhöhten Gehalt auf, der jedoch statistisch nicht signifikant war.

2. Im Gegensatz zu Morphin zeigte das Racemat Tramadol (46,4 mg/kg i.p., 1 h p.a.) keinen gleichförmigen Einfluß auf den Dopamin-Gehalt.
3. Sowohl Tramadol als auch Morphin führten mit den unter 1. und 2. genannten Dosierungen in allen untersuchten Arealen zu einer statistisch signifikanten Zunahme des Dopamin-Metaboliten DOPAC (0,5-1,5 h p.a.).
Eine Zunahme des DOPAC-Gehaltes deutet auf einen gesteigerten Umsatz des Transmitters hin (Turnover-Erhöhung). Die Wirkung von Tramadol war nach 1 h am stärksten ausgeprägt, nach 1,5 h flachte die Erhöhung bereits wieder ab, war jedoch gegenüber der Kontrollgruppe immer noch signifikant ausgeprägt.
4. HVA, das Stoffwechselendprodukt des Dopamins, welches nur im Areal C.STRI bestimmt wurde, war ebenfalls 1 h nach Tramadolapplikation (46,4 mg/kg i.p.) signifikant erhöht von 6,41 auf 9,46 nMol/g. Nach 1,5 h stieg der Gehalt auf 11,18 nMol/g Gehirngewebe an.
5. Die Tramadol-induzierte DOPAC- und HVA-Erhöhung war enantioselektiv. Alleinige Wirkkomponente war das (+) Tramadol (46,4 mg/kg i.p., 1 h nach Applikation). Das (-) Enantiomer verhielt sich inaktiv (46,4 mg/kg i.p.).
6. Mit Hilfe des Opioid-Antagonisten Naloxon (2x10 mg/kg i.p. zum Zeitpunkt 0 und 30 min später) konnte die Morphin-induzierbare Zunahme des DOPAC-Gehaltes antagonisiert werden.

7. Der durch (+) Tramadol-induzierbare Anstieg des Gehaltes von DOPAC in allen Arealen und der von HVA im C. STRI konnte gleichfalls mit Naloxon aufgehoben werden.
8. Spezielle Untersuchungen zum Turnover (α -MPT-Methode) zeigten, daß Morphin (21,5 mg/kg i.p. 1 h p.a.) die DA-Umsatzgeschwindigkeit (Turnover) in den 5 untersuchten Gehirnarealen steigerte. (α -MPT-Methode: Nach Hemmung der Catecholaminbiosynthese mit α -MPT in einer Dosierung von 200 mg/kg i.p. konnte der Einfluß von Substanzen auf die Abbaugeschwindigkeit der Neurotransmitter DA und NA bestimmt werden)
9. Das (+) Enantiomer von Tramadol (46,4 mg/kg i.p. 1 h p.a.) führte zu einer statistisch signifikanten Steigerung des DA-Turnovers von 0,21 (Kontrolle) auf 0,31 nMol/g/h in M+P und von 8,04 auf 13,20 nMol/g/h im Corpus striatum. Die Turnoverzeiten reduzierten sich dementsprechend in den beiden genannten Arealen von 1,82 (Kontrolle) auf 1,27 h und von 3,22 auf 1,92 h.
Das (-) Enantiomer verhielt sich inaktiv.
10. Tramadol erhöhte den Release von Dopamin.
Der DA-Metabolit 3-MT ist, sofern er in Gegenwart eines Monoamino-Oxidase-Inhibitors (Tranlylcypromin 10 mg/kg i.p.) gemessen wird, ein Maß für den DA-Release.
Tramadol (46,4 mg/kg i.p. 1 h p.a.) erhöhte den 3-MT-Gehalt signifikant in den Arealen M+P, HYPO und C. STRI.

Die Tramadol-induzierte enantioselektive Steigerung des Dopamin-Turnovers steht im Einklang mit in vitro-Befunden, die aussagen, daß auch das (+) Enantiomer die größte Affinität zu den Opioidrezeptoren hat. Die Tatsache, daß der erhöhte Turnover unter Tramadoleinfluß mit Naloxon antagonisiert werden kann, ist ein weiterer Beweis dafür, daß ein opioider

Mechanismus an dem Wirkprofil von Tramadol beteiligt ist.

Noradrenalin:

11. Morphin führte zu einer signifikanten Reduktion von Noradrenalin (NA) im HYPO (21,5 mg/kg i.p., 1h p.a.).
12. Morphin (21,5 mg/kg i.p.) bewirkte eine signifikante NA-Turnover-Erhöhung in den Arealen M+P, HYPO und C.STRI, ebenfalls 1 h nach Applikation.
Diese Ergebnisse wurden wie im Falle von Dopamin gleichfalls mit Hilfe der α -MPT-Methode erzielt.
13. Tramadol, in einer Dosierung von 46,4 mg/kg i.p., zeigte ansatzweise eine leichte, nicht signifikante Erhöhung des NA-Turnovers im HYPO von 0,93 auf 1,15 nMol/g/h, im CORTEX von 0,24 auf 0,34 nMol/g/h. Im CEREB konnte eine signifikante Erhöhung von 0,21 auf 0,36 nMol/g/h festgestellt werden.
14. Die Versuche zur Enantioselektivität von Tramadol ergaben unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen (wie z.B. Dosierungen, Zeitabstände zwischen Tramadolapplikation und Probengewinnung) keine weiteren signifikanten Veränderungen bezüglich der noradrenergen Neurotransmission.

Serotonin:

15. Morphin (21,5 mg/kg i.p.) führte in den Arealen CORTEX, M+P und CEREB zu einer signifikanten Erhöhung des 5-HT-Gehaltes.
16. Morphin führte 0,5-1,5 h p.a. in der unter 15. genannten Dosierung zu einer signifikanten Anhebung des Hauptmetaboliten 5-HiAA in allen 5 untersuchten Arealen.

17. Tramadol (46,4 mg/kg i.p.) reduzierte den Gehalt an 5-HT 1,0-1,5 h nach Applikation signifikant in den Arealen CORTEX, M+P und HYPO.
18. Tramadol (46,4 mg/kg i.p.) reduzierte signifikant den Gehalt von 5-HiAA in den Arealen CORTEX, M+P und HYPO.
19. Morphin (21,5 mg/kg i.p.) erhöhte den 5-HT-Turnover signifikant in den Arealen CORTEX, M+P, HYPO und CEREB (5-HT-Turnover-Bestimmungsmethode mit Probenecid: Nach Gabe von 200 mg/kg i.p. Probenecid können die sauren Metabolite, so auch 5-HiAA nicht mehr aus dem Hirn abtransportiert werden. Der zeitabhängige, lineare Anstau an 5-HiAA kann als Maß für die 5-HT-Abbaugeschwindigkeit genommen werden, da beinahe das gesamte 5-HT zu 5-HiAA degradiert wird).
20. Die Morphin-bedingte Erhöhung des 5-HT-Turnovers war mit Naloxon (2x 5 mg/kg i.p. zum Zeitpunkt 0 und 30 min) antagonisierbar (1 h nach Morphinapplikation).
21. Tramadol (46,4 mg/kg i.p.) erniedrigte den Turnover von Serotonin.
Für die einzelnen Areale ergaben sich 1,5 h p.a. folgende signifikanten Ergebnisse: Die 5-HiAA-Akkumulationsraten sanken im CORTEX von 1,25 auf 0,87 nMol/g/h, in M+P von 1,28 auf 0,92 nMol/g/h, im HYPO von 2,48 auf 1,05 nMol/g/h, im C. STRI von 1,65 auf 0,93 nMol/g/h und im CEREB von 0,47 auf 0,27 nMol/g/h. Dieser Effekt war nicht stereoselektiv, da beide Enantiomere zu der beschriebenen Turnover-Reduktion führen.
22. Der 5-HT-Reuptake-Inhibitor Fluoxetin (20 mg/kg i.p.) erniedrigte den 5-HT-Turnover in allen untersuchten Hirnarealen 1,5 h nach Applikation.

Zum ersten Mal wird mit diesen Befunden gezeigt, daß Tramadol einen Einfluß auf das dopaminerge System hat. Die Dopamin-Turnover-Erhöhung wird wie auch bei Morphin über einen opioiden Mechanismus gesteuert. Im Gegensatz zu Morphin, das den 5-HT-Turnover steigert, führt Tramadol jedoch zu einer Reduktion des 5-HT-Turnovers. Diese Reduktion der Serotonin-Umsatzgeschwindigkeit wird von einer nicht-opioiden Wirkkomponente des Tramadols getragen, und es kann davon ausgegangen werden, daß wie im Fall von Fluoxetin gezeigt, dieser Effekt unter Beteiligung einer Reuptake-Inhibition zustande kommt.

Martin Christoph Frink

Influence of the centrally acting analgesic tramadol (Tramal[®]) on the neurotransmitter systems dopamine, noradrenaline and serotonin in five definite areas of the rat brain.

8. Summary

Tramadol is a centrally acting analgesic. It is a racemic mixture and consists of 50% (+) and 50% (-) tramadol. It has common structural elements with morphine (see page 1).

In-vitro studies by several scientific groups have shown that noradrenaline and serotonin are involved in the antinociceptive action of tramadol. Further it is known that centrally acting opioids (morphine) have an influence on the dopaminergic neurotransmission in definite areas of the brain. Concerning tramadol, nothing was known about an influence on this special neurotransmitter. These are the reasons why the influence of tramadol on dopamine, noradrenaline and serotonin should be investigated in ex-vivo experiments.

Male SPF Wistar rats with a body weight of 190-220 g were treated with test compounds and morphine and fluoxetine as reference compounds. Afterwards the animals were stunned and sacrificed by decapitation. The following 5 brain areas were prepared: frontal and temporal cortex (CORTEX), hypothalamus (HYPO), medulla and pons (M+P), corpus striatum (C. STRI) and cerebellum (CEREB). The levels of the neurotransmitters and the main degradation products thereof were estimated: DA with DOPAC, HVA and 3-MT, NA and 5-HT with 5-HiAA. The separation and quantification of these compounds were performed using high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD).

The following data were obtained:

Dopamine:

1. The DA-level in the areas M+P and C.STRI was significantly enhanced 1-1.5 h after morphine application (21.5 mg/kg i.p.).

An elevated level of DA in the other areas under assay, HYPO and CEREB, was also found with this compound (statistically not significant).

2. In contrast to morphine, the racemic compound tramadol showed no uniform influence on the DA-level (46.4 mg/kg i.p.)
3. In all areas tested, tramadol as well as morphine (dosages mentioned under 1 and 2) showed a statistically significant enhancement of the DA-metabolite DOPAC (0.5-1.5 h after application).

An enhanced DOPAC level is an indication of an increased turnover of this neurotransmitter.

The highest effect of tramadol was found 1 h p.a..

The DOPAC level 1.5 h p.a. was lower but still significantly increased in comparison with the control group.

4. HVA, the main degradation product of DA (only estimated in C.STRI), was also significantly increased 1 h after tramadol application (46.4 mg/kg i.p., control 6.41, tramadol 9.46 nMol/g). After 1.5 h the difference between control and tramadol group was even more pronounced (6.41 nmol/g compared to 11.18 nmol/g).
5. The tramadol-induced DOPAC and HVA enhancement was enantioselective. Only the (+) enantiomer of tramadol (46.4 mg/kg i.p.) was active 1 h p.a.. The (-) enantiomer was inactive (46.4 mg/kg i.p., 1 h p.a.).
6. The morphine-induced DOPAC elevation could be antagonized by naloxone (2 x 10 mg/kg i.p., at zero time and 30 min later).
7. The (+) tramadol-induced enhancement of DOPAC (measured in all areas) and HVA in C STRI could be antagonized by naloxone (2 x 10 mg/kg i.p., at zero time and 30 min later).

8. By using a special assay to estimate the DA turnover (α -MPT method) it could be shown that morphine enhanced the DA-turnover in all 5 brain areas tested (α -MPT method: after inhibition of the biosynthesis of the catecholamines with α -MPT (200 mg/kg i.p.) it is possible to detect the influence of test drugs on the rate of degradation of the neurotransmitters DA and NA).
9. The (+) enantiomer of tramadol (46.4 mg/kg i.p., 1 h p.a.) induced a statistically significant elevation of the DA turnover (M+P: control 0.21 nmol/g/h -- tramadol 0.31 nmol/g/h; C.STRI: 8.04 -- 13.2 nmol/g/h)
Correspondingly, the turnover times were reduced in these areas (M+P: 1.82 h to 1.27 h and C.STRI: 3.22 h to 1.92 h). The (-) enantiomer was inactive.
10. Tramadol increased the release of dopamine.
The DA-metabolite 3-MT is a measure of DA release if this metabolite is quantified in the presence of an MAO inhibitor (tranylcypromine 10 mg/kg i.p.).
Tramadol (46.4 mg/kg i.p., 1 h p.a.) increased the level of 3-MT in M+P, HYPO and C.-STRI in a significant manner.

The finding that the (+) enantiomer of tramadol enhanced the DA turnover is in agreement with the results of other scientific groups who reported that the (+) enantiomer of tramadol has the better affinity to the opioid receptors. The fact that the DA turnover enhancement by tramadol could be antagonized by naloxone is a further direct indication of an involvement of an opioid mechanism.

Noradrenaline:

11. Morphine decreased the level of NA in the HYPO (21.5 mg/kg i.p., 1 h p.a.).

12. Application of 21.5 mg/kg i.p. of morphine resulted in a significantly enhanced NA turnover in the brain areas M+P, HYPO and C. STRI 1 h after drug application (α -MPT method).
13. Tramadol (46.4 mg/kg i.p., 1 h p.a.) showed only a minor NA turnover enhancement which was not significant. (HYPO: control 0.93 nmol/g/h--tramadol 1.15 nmol/g/h; CORTEX: 0.24 -- 0.34)
In CEREB the elevation was significant (0.21 -- 0.36).
14. All other experimental conditions (variations in dosages, timeframes, etc.) showed no further significant effects concerning the noradrenergic neurotransmission.

Serotonin:

15. Morphine (21.5 mg/kg i.p.) increased the levels of 5-HT in CORTEX, M+P and CEREB significantly.
16. In all 5 areas tested, morphine (21.5 mg/kg i.p., 1-1.5 h p. a.) elevated the main 5-HT metabolite 5-HiAA.
17. Tramadol (46.4 mg/kg i.p.) reduced the 5-HT level 1-1.5 h after drug application in the brain areas CORTEX, M+P and HYPO.
18. At a dose of 46.4 mg/kg i.p., tramadol reduced the 5-HiAA level in CORTEX, M+P and HYPO.
19. The 5-HT turnover was significantly elevated by morphine (21.5 mg/kg i.p.) in CORTEX, M+P, HYPO and CEREB (5-HT turnover method by use of probenecid:

The acid metabolites (e.g. 5-HiAA) cannot be transported out of the brain after application of 200 mg/kg i.p. of probenecid. Therefore, probenecid application results in a linear time-dependent accumulation of 5-HiAA. Since nearly all 5-HT is degraded to 5-HiAA, the rate of 5-HiAA accumulation is a reliable measure of 5-HT degradation).

20. The morphine-induced 5-HT turnover enhancement could be antagonized by naloxone (2 x 5 mg/kg i.p. at zero time and 30 min later) 1 h after application of morphine.
21. Tramadol (46.4 mg/kg i.p., 1.5 h p.a.) reduced the turnover of 5-HT in a significant manner. The following data were obtained: CORTEX: control 1.25 nmol/g/h -- tramadol 0.87 nmol/g/h; M+P: 1.28 -- 0.92; HYPO: 2.48 -- 1.05; C. STRI: 1.65 -- 0.93; CEREB: 0.47 -- 0.27.
This effect was not stereoselective because both enantiomers showed this significant reduction in 5-HT turnover.
22. The 5-HT reuptake inhibitor fluoxetine (20 mg/kg i.p., 1.5 h p.a.) decreased the 5-HT turnover in all brain areas tested.

This is the first time that it was possible to document that tramadol has a significant influence on the dopaminergic system. It could be shown that the DA-turnover enhancement is mediated by an opioid mechanism as is the case with the reference compound morphine. In contrast to morphine, which stimulated the 5-HT turnover, tramadol reduced the turnover of this indolamine. The significant reduction of 5-HT turnover is obviously mediated by a nonopioid component of tramadol and (as shown by the reference compound fluoxetine) is probably related to the ability to inhibit the neuronal uptake of this neurotransmitter.