

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie

Direktor: Prof. Dr. Karl-Heinz Frosch

## **Der selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer Reboxetin verbessert die späte Phase der Frakturheilung im Mausmodell**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Antonia Simone Donat  
aus Berlin

Hamburg 2023

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.03.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thorsten Schinke**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Johannes Keller**

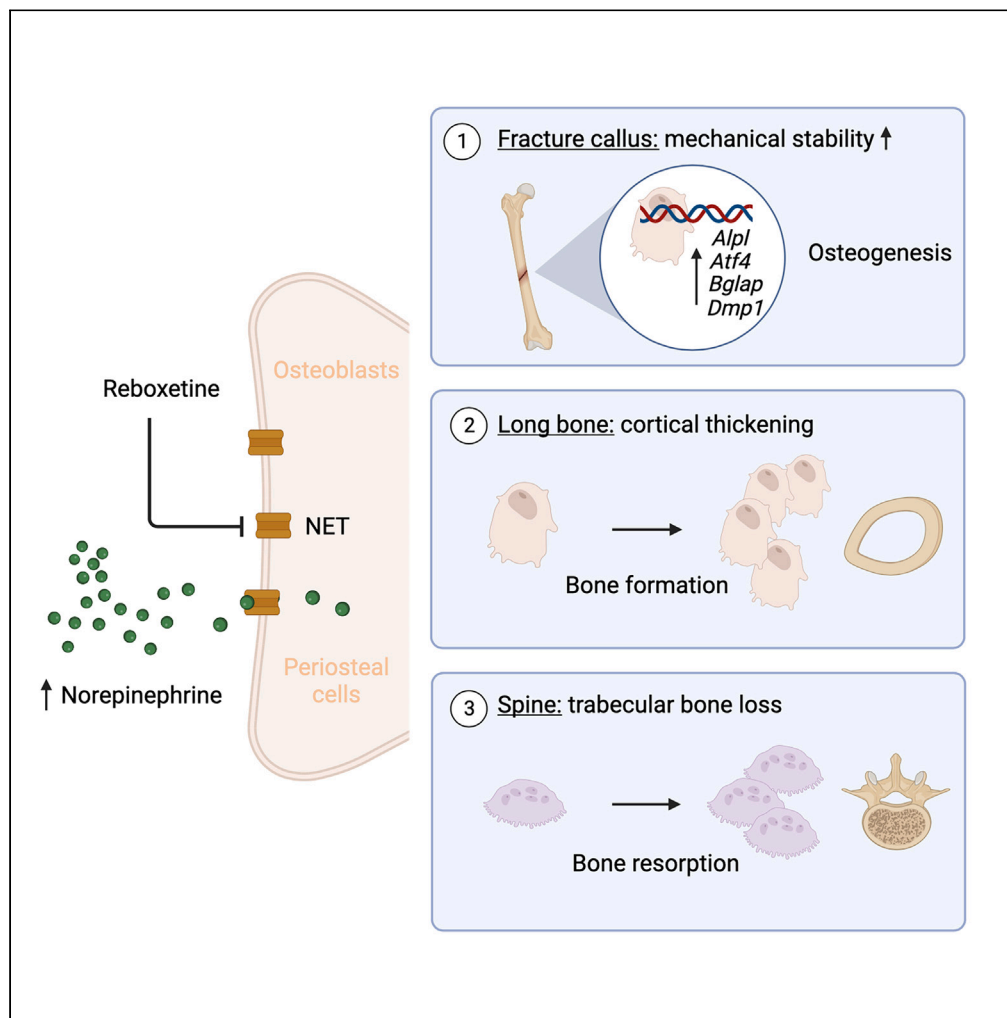
**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Publikation</b>	<b>4</b>
<b>Zusammenfassende Darstellung</b>	<b>20</b>
Einleitung	20
Ergebnisse	21
Diskussion	23
Zusammenfassung	27
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>28</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>32</b>
<b>Erklärung des Eigenanteils an der Publikation</b>	<b>33</b>
<b>Danksagung</b>	<b>34</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>35</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>36</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>37</b>

Article

# The selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine promotes late-stage fracture healing in mice



Antonia Donat,  
Shan Jiang, Weixin  
Xie, ..., Serafeim  
Tsitsilonis, Anke  
Baranowsky,  
Johannes Keller

j.keller@uke.de

Highlights

The SNRI reboxetine decreases bone volume in the spine in mice with femoral fractures

Reboxetine increases femur cortical thickness in mice with contralateral fractures

Reboxetine improves late-stage fracture healing through promoting osteogenesis

Donat et al., iScience 26, 107761  
October 20, 2023 © 2023 The Author(s).  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107761>



## Article

# The selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine promotes late-stage fracture healing in mice

Antonia Donat,<sup>1</sup> Shan Jiang,<sup>1</sup> Weixin Xie,<sup>1</sup> Paul Richard Knapstein,<sup>1</sup> Lilly-Charlotte Albertsen,<sup>1</sup> Judith Luisa Kokot,<sup>1</sup> Jan Sevecke,<sup>1</sup> Ruben Augustin,<sup>1</sup> Denise Jahn,<sup>2,3</sup> Timur Alexander Yorgan,<sup>4</sup> Karl-Heinz Frosch,<sup>1,5</sup> Serafeim Tsitsilonis,<sup>2,3</sup> Anke Baranowsky,<sup>1</sup> and Johannes Keller<sup>1,6,\*</sup>

**SUMMARY**

**Impaired fracture healing is of high clinical relevance, as up to 15% of patients with long-bone fractures display non-unions. Fracture patients also include individuals treated with selective norepinephrine reuptake inhibitors (SNRI). As SNRI were previously shown to negatively affect bone homeostasis, it remained unclear whether patients with SNRI are at risk of impaired bone healing. Here, we show that daily treatment with the SNRI reboxetine reduces trabecular bone mass in the spine but increases cortical thickness and osteoblast numbers in the femoral midshaft. Most importantly, reboxetine does not impair bone regeneration in a standardized murine fracture model, and even improves callus bridging and biomechanical stability at late healing stages. In sum, reboxetine affects bone remodeling in a site-specific manner. Treatment does not interfere with the early and intermediate stages of bone regeneration and improves healing outcomes of the late-stage fracture callus in mice.**

**INTRODUCTION**

The skeleton is constantly being remodeled by the activity of bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts. In the healthy, weight bearing skeleton, only gross forces may inflict injury to the bone with a resulting fracture. After a fracture occurs, bone regeneration, an evolutionary highly preserved process, allows the scarless healing of the injured bone. Similar to bone remodeling, the balanced activity of osteoclasts and osteoblasts is essential for adequate remodeling of the fracture callus and overall outcome of bone healing. However, despite treatment according to best practice nowadays, risks still range between 10 and 15% that the bone will not heal, resulting in fracture non-union.<sup>1,2</sup> Impaired bone healing exerts a severe burden on affected patients, as they require multiple revision surgeries, are prone to further complications (e.g., infection), and experience prolonged immobilization and inability to work.<sup>3,4</sup>

Both bone remodeling and regeneration are regulated by common key factors, including mechanical load, hormones, and cytokines amongst many others. Research in the past two decades has provided ample evidence that bone remodeling is also controlled by nerves and locally released neurotransmitters. In particular, the sympathetic nervous system was shown to potently affect both osteoclast and osteoblast function.<sup>5,6</sup> The current model of how peripheral sympathetic nerves affect the skeleton includes the release of norepinephrine (NE), which then binds to the beta 2 adrenoreceptor expressed on osteoblasts. This leads to an inhibition of osteoblast proliferation and an induction of pro-resorptive RANKL, overall resulting in decreased bone formation and increased bone resorption.<sup>7</sup> Apart from alterations in sympathetic tone, NE levels in bone are also regulated by the NE transporter (NET), which, in addition to presynaptic neurons, is also expressed in bone cells.<sup>8</sup> In this regard it was demonstrated that osteoblasts and osteocytes exhibit NE uptake activity via NET and can catabolize but not generate NE.<sup>9</sup>

From a pharmacological perspective, NET is a principal target of drugs used for the treatment of psychiatric disorders such as depression, anxiety or attention deficit hyperactivity disorders.<sup>10–12</sup> Based on NET expression in osseous tissue, clinical concerns have been raised about potential adverse effects of NET inhibitors regarding skeletal health. In fact, mice with genetic inactivation of NET, or pharmacologic blockade of NET via the selective norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) reboxetine, were reported to display trabecular bone loss due to decreased

<sup>1</sup>Department of Trauma and Orthopedic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Center for Musculoskeletal Surgery, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, 13353 Berlin, Germany

<sup>3</sup>Berlin Institute of Health at Charité-Universitätsmedizin Berlin, Julius Wolff Institute, 13353 Berlin, Germany

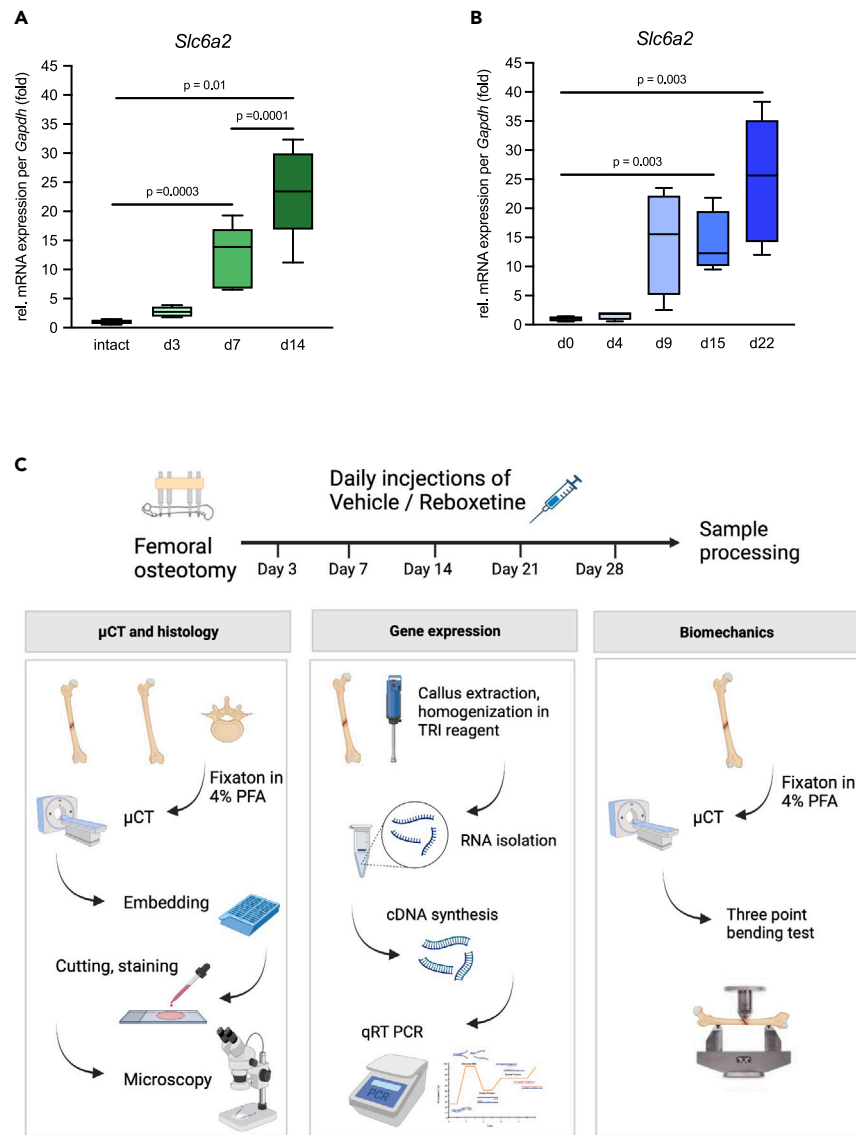
<sup>4</sup>Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany

<sup>5</sup>Department of Trauma Surgery, Orthopedics and Sports Traumatology, BG Hospital Hamburg, 21033 Hamburg, Germany

<sup>6</sup>Lead contact

\*Correspondence: [j.keller@uke.de](mailto:j.keller@uke.de)  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107761>





**Figure 1. Expression of the norepinephrine transporter *Slc6a2* increases during bone healing**

(A and B) (A) qRT-PCR of NET expression (encoded by *Slc6a2*) in the fracture callus ( $n = 6$  mice) compared to intact femoral bone ( $n = 6$  sham operated mice; corresponding midshaft area), and (B) in periosteal cells ( $n = 6$  independent cultures) undergoing osteogenic differentiation at the indicated time. Non-parametric Mann–Whitney U test, data are shown in boxplots with median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quantiles. Whiskers indicate upper and lower extremes, respectively. (C) Schematic representation of the study protocol and respective algorithm for sample assessment.

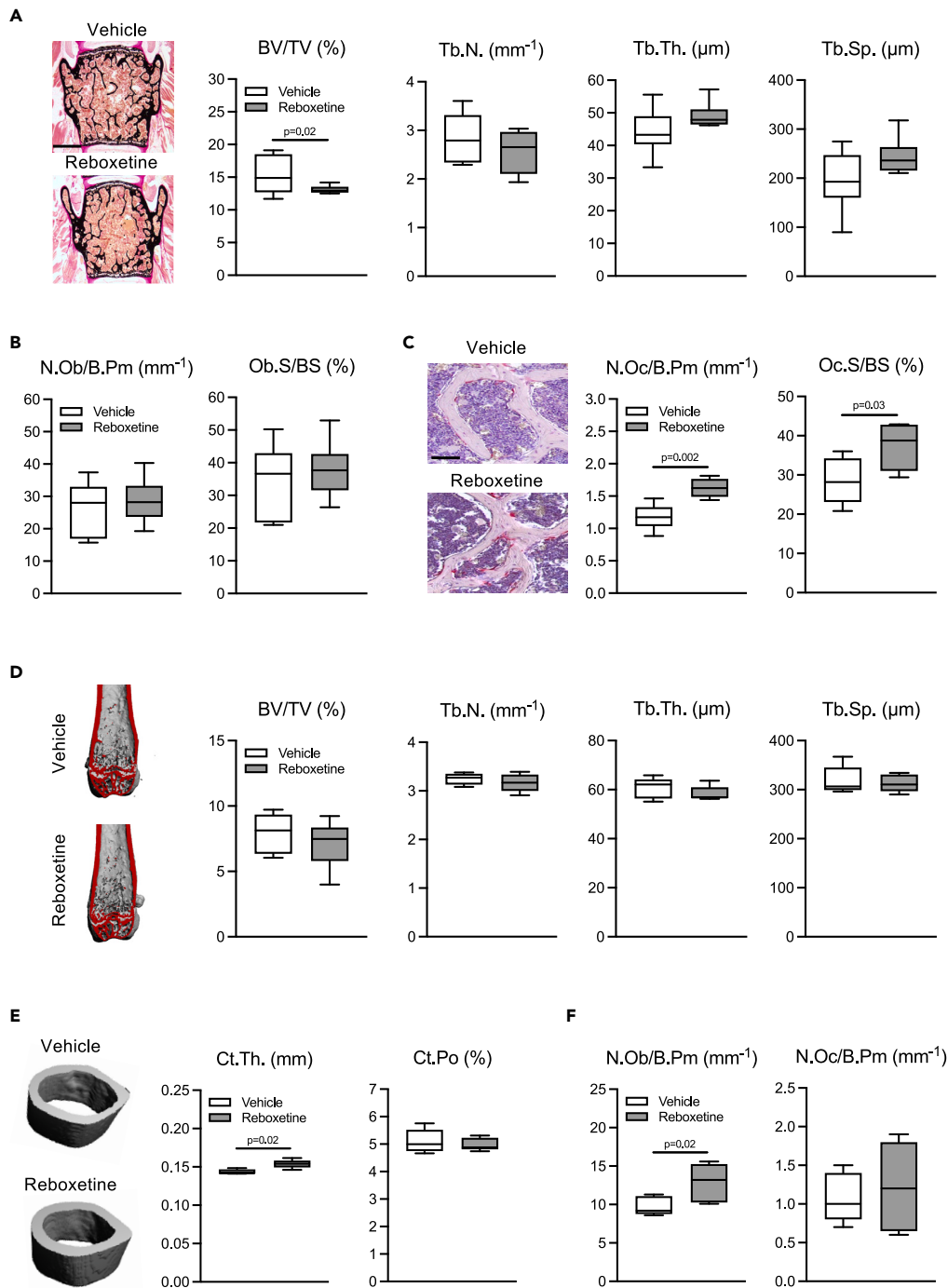
bone formation and an enhanced bone resorption.<sup>9</sup> Although solid evidence is still lacking due to only a limited number of studies, available clinical data suggests that patients prescribed SNRI display an increased fracture risk.<sup>13</sup>

Although accumulating evidence supports a pivotal role of NET in the regulation of bone remodeling, its impact on bone regeneration is unknown. However, this is especially relevant in orthopedic trauma surgery, as a considerable proportion of fracture patients are prescribed with SNRI.<sup>14</sup> In the current study, we thus hypothesized that SNRI application impairs fracture healing and results in an increased rate of fracture non-union in mice.

## RESULTS

### Expression of the norepinephrine transporter *Slc6a2* increases during bone healing

To investigate a possible role of reboxetine in bone regeneration, we first monitored expression of NET, encoded by *Slc6a2* and representing the principal target of reboxetine, during bone healing. While expressed at comparatively low levels in the midshaft of non-fractured femora, *Slc6a2* expression dramatically increased in the callus throughout the course of bone healing (Figure 1A). Likewise, *ex vivo* generated



**Figure 2. Systemic reboxetine treatment exerts distinct effects in the non-fractured skeleton**

(A) Left: Representative von Kossa/van Gieson staining of undecalcified vertebra sections (L4) following 21 days of treatment with reboxetine (15 mg kg<sup>-1</sup>) or vehicle in mice with a femoral fracture. Scale bar = 500 μm. Right: Histomorphometric quantification of the indicated structural bone parameters in the same groups. BV/TV = bone volume per tissue volume, Tb.N. = trabecular number, Tb.Th. = trabecular thickness, Tb.Sp. = trabecular separation.

(B) Histomorphometric quantification of the indicated cellular parameters of bone formation. N.Ob/B.Pm = osteoblast numbers per bone perimeter, Ob.S/BS = osteoblast surface per bone surface.

(C) Histomorphometric quantification of the indicated cellular parameters of bone resorption. N.Oc/B.Pm = osteoclast numbers per bone perimeter, Oc.S/BS = osteoclast surface per bone surface. Representative TRAP-stained vertebra sections are displayed in the left. Scale bar = 50 μm.

(D) Representative μCT images of the non-fractured, distal femur and quantification of trabecular bone volume per tissue volume in addition to trabecular number, thickness and separation after 21 days of treatment with reboxetine (15 mg kg<sup>-1</sup>) or vehicle in mice with a contralateral femoral fracture.

**Figure 2. Continued**

(E) Representative  $\mu$ CT images of the midshaft non-fractured femur, and quantification of cortical bone parameters in the same groups. Ct.th. = cortical thickness, Ct.Po = cortical porosity.

(F) Osteoblast and osteoclast numbers in the midshaft non-fractured femur of the same mice. n = 6 mice per group. Unpaired Student's t test, data are shown in boxplots with median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quantiles. Whiskers indicate upper and lower extremes, respectively.

periosteal cells undergoing osteogenic differentiation displayed a steadily increasing expression of *Slc6a2* (Figure 1B). As these observations suggested a possible role of NE reuptake in fracture healing, we subjected mice to a femoral osteotomy stabilized by an external fixator. At the day of surgery, daily systemic injections with reboxetine or vehicle were initiated and continued until sacrifice, when fractured and non-fractured bone samples were collected at pre-determined time points representing the early, intermediate, and late stages of bone healing (Figure 1C). In line with previous reports in mice lacking *Slc6a2* globally,<sup>9</sup> increased serum levels of NE were detected in mice treated with reboxetine for 3 weeks (Figure S1A). In addition, increased expression of *uncoupling protein 1* (*Ucp1*) was detected in the fracture callus 3 days following osteotomy in treated mice, indicative of enhanced NE signaling (Figure S1B).

**Systemic reboxetine treatment exerts distinct effects in the non-fractured skeleton**

Previously it was shown that systemic reboxetine treatment decreases trabecular bone mass. Therefore, to assess the pharmaceutical efficacy of our chosen approach, we first analyzed bone architecture in the intact skeleton, including the spine and the contralateral non-fractured femur. While trabecular number, thickness and separation were not significantly altered, we observed a decrease in bone volume per tissue volume in undecalcified spine sections derived from mice treated with reboxetine 21 days following surgery (Figure 2A). Similar observations were made using  $\mu$ CT scanning of spine samples, which revealed a decrease in bone volume per tissue volume and trabecular number in the reboxetine group (Figure S2A). Histomorphometrically, osteoblast parameters, indicative of bone formation, were unaffected, however, a significant increase in both osteoclast numbers and surface was detected as a potential explanation (Figures 2B and 2C). In the distal femur, reboxetine treatment was not associated with alterations in trabecular bone architecture or an alteration in cellular osteoblast and osteoclast parameters (Figures 2D and S2B). In contrast, while osteocyte numbers were unaltered (Figure S2C), an increased cortical thickness, accompanied by normal cortical porosity, was detected in the femoral midshaft of reboxetine-treated mice (Figure 2E). Here, histomorphometric assessment revealed an elevation in endocortical osteoblast numbers, whereas osteoclast numbers were unaffected (Figure 2F). These results confirmed the pharmacological efficacy of reboxetine administration and demonstrated a site-specific skeletal impact of reboxetine.

**Reboxetine does not impair the early and intermediate stages of fracture healing and is associated with increased cellular indices of bone formation in the fracture callus**

Using  $\mu$ CT scanning, we next monitored osseous callus formation at early (day 7 and 14) and intermediate (day 21) time points after surgery. A regular course of callus mineralization was observed in mice treated with reboxetine (Figure 3A). Quantification of radiologic callus parameter revealed neither differences in bone and tissue volume nor in bone surface and bone mineral density of callus tissue at these time points (Figure 3B). Histological analysis of non-decalcified cryo-sections of callus tissue confirmed that reboxetine did not interfere with bone regeneration at early and intermediate stages of the healing process (Figure 4A). In particular, quantification of cartilaginous and mineralized components of the callus revealed no significant alterations 7, 14 and 21 days after surgery (Figure 4B). Finally, we assessed the cellular callus parameters 21 days after surgery, as this represents a time point of intense cellular callus remodeling. Osteoclast parameters were not altered, however, mice treated with reboxetine displayed elevated osteoblast numbers and surface (Figures 4C and 4D).

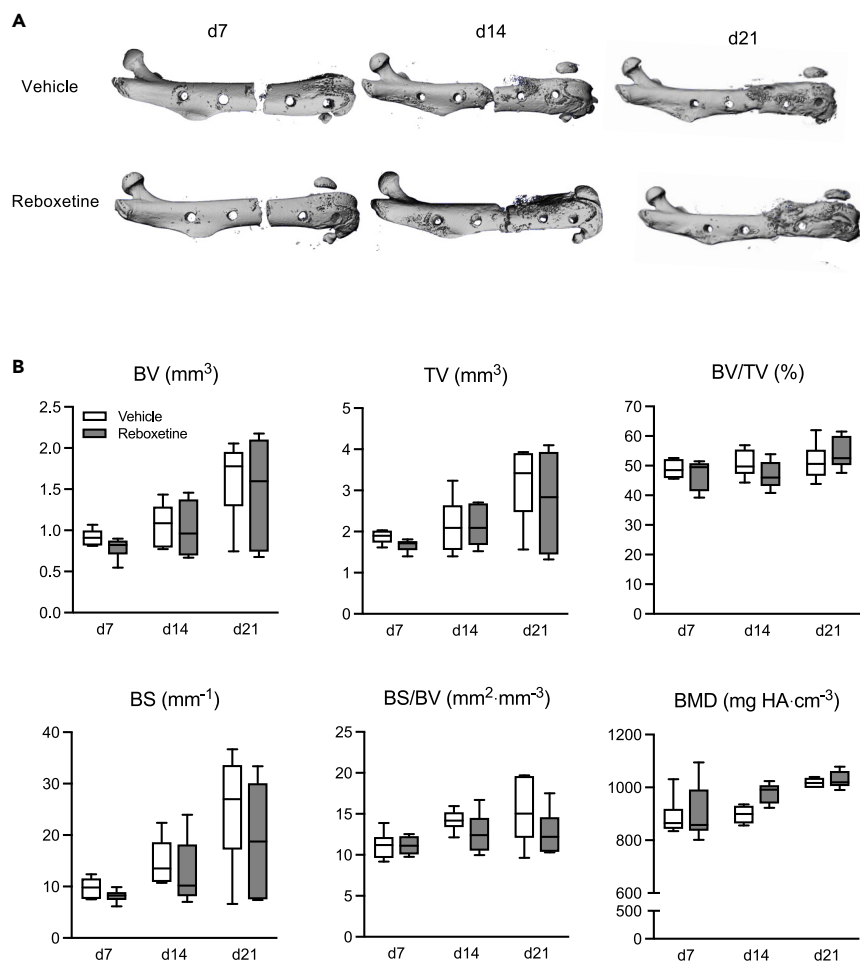
**Reboxetine improves late-stage fracture healing**

Based on the above observations, we assayed fracture healing 28 days following surgery, corresponding to the late stage of bone healing in mice.  $\mu$ CT scanning demonstrated no significant alteration in bone volume and tissue volume of the fracture callus (Figures 5A and 5B). However, monitoring osseous bridging of fracture ends, we observed improved fracture union in mice receiving reboxetine (Figure 5C). In line with this finding, the biomechanical stability of healed bones was superior in reboxetine-treated mice, as evidenced by an increased maximal force and required work to structural failure (Figure 5D).

**Reboxetine induces the expression of osteoblast markers in the early healing stage**

To understand this observation on a molecular level, we subjected mice to a femoral osteotomy and extracted callus mRNA 3, 7, and 14 days after surgery. Monitoring the expression of markers for angiogenesis and inflammation, both processes pivotal to bone regeneration, no significant differences were found except for platelet-derived growth factor receptor beta (*Pdgfrb*), whose expression was decreased 7 days following osteotomy (Figures 6A and 6B). Likewise, expression of the osteoclast markers *Calcr* (encoding the calcitonin receptor) and *Ctsk* (encoding cathepsin K) did not differ between reboxetine- and vehicle-treated mice (Figure 6C). In the case of osteoblast parameters, we detected an increased expression of *Alpl* (alkaline phosphatase), *Atf4* (encoding the key osteoblast activating transcription factor 4), *Bglap* (encoding osteocalcin, indicative of osteoblast function), and *Dmp1* (encoding dentin matrix protein 1 involved in matrix mineralization) in the reboxetine group at day 3 following surgery, which normalized during the subsequent course of bone regeneration and were found decreased by tendency at post-operative day 14 (Figure 6D). These indices of enhanced osteogenesis were confirmed by enhanced alkaline phosphatase activity in the callus of mice receiving reboxetine 7 days following osteotomy (Figure S3).





**Figure 3. Reboxetine does not impair the early or intermediate stages of fracture healing**

(A) Representative  $\mu$ CT images of the healing femur of reboxetine- and vehicle-treated mice 7, 14, and 21 days following fracture.

(B) Quantitative analysis of  $\mu$ CT images in the same mice. BV = total callus bone volume, TV = total tissue volume, BV/TV = bone volume vs. tissue volume, BS = bone surface, BS/BV = bone surface vs. bone volume, BMD = bone mineral density.

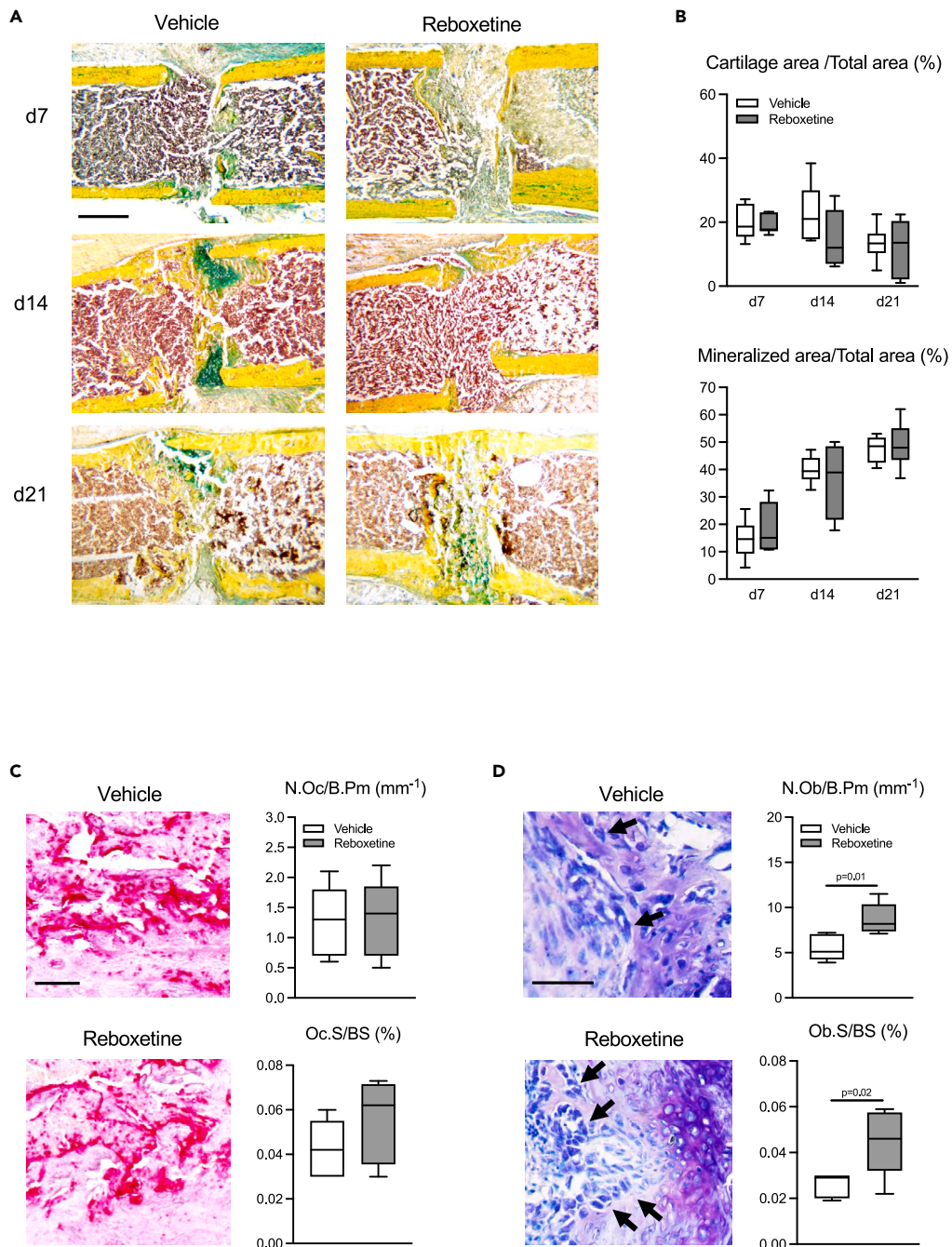
n = 6 mice per group. Unpaired Student's t test, data are shown in boxplots with median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quantiles. Whiskers indicate upper and lower extremes, respectively.

## DISCUSSION

In the current study, we investigated the impact of systemic treatment with the SNRI reboxetine on bone regeneration in mice. Based on the previously reported, negative impact on bone remodeling with increased bone resorption and decreased bone formation, we hypothesized that reboxetine impairs bone healing, which is of clinical importance in fracture patients prescribed SNRI. Based on the results of this study, our hypothesis was rejected, as reboxetine did not impair early and intermediate healing stages, and even improved long-term regenerative outcomes.

Prior studies using genetic and pharmacological approaches provide solid evidence that beta-adrenergic signaling is a key determinant of bone remodeling. Global and osteoblast genetic ablation of the beta 2 adrenoreceptor results in high trabecular bone mass, as bone formation is enhanced, and bone resorption reduced.<sup>15</sup> These findings underline the importance of sympathetic innervation of bone tissue and neuronal control of bone cell activity. A previous study elegantly showed that osteoblasts express NET and are capable of NE uptake and degradation, thus contributing significantly to the delicate homeostasis of NE signaling in the skeleton.<sup>9</sup> The authors also showed that both pharmacologic inhibition via reboxetine, or genetic inactivation of NET, resulted in decreased trabecular bone mass. While these effects were observed in both spine and femur of male mice, trabecular bone loss exclusively in the axial skeleton, but not long bones, was observed in the case of female animals in the respective study.

In our current study, we employed only female mice to investigate the effect of reboxetine on bone regeneration. In concordance with the previous study by Ma et al., we observed a decreased trabecular bone volume in the spine, but not femur, after 21 days of systemic reboxetine treatment, indicating effective administration of reboxetine. In the spine, this effect was accompanied by an increase in osteoclast



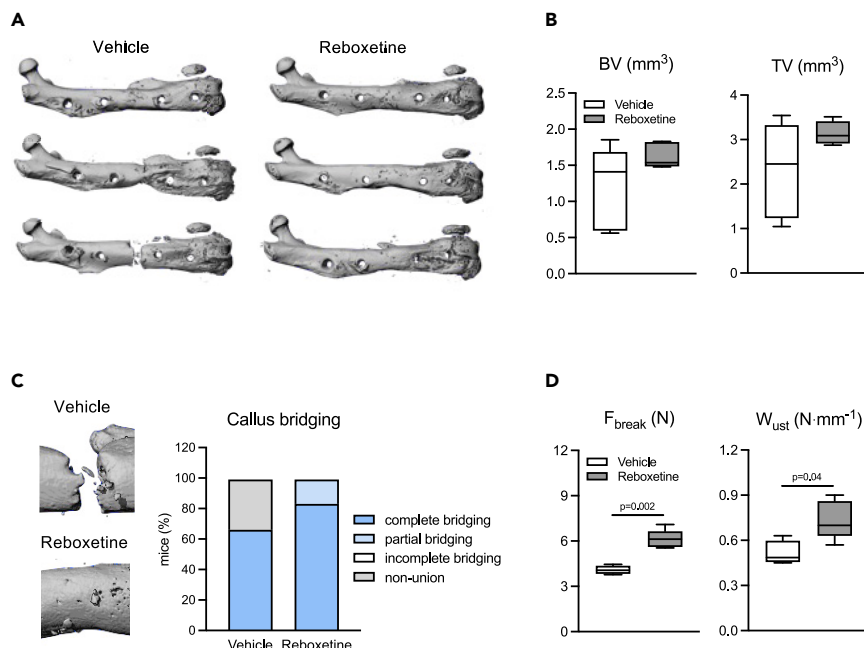
**Figure 4. Reboxetine is associated with increased cellular indices of bone formation in the fracture callus**

(A) Representative callus sections (Movat's Pentachrome staining) of reboxetine- and vehicle-treated mice at the indicated time points (yellow = mineralized bone; green = cartilage; reddish/brown = bone marrow). Scale bar = 500  $\mu$ m.

(B) Histomorphometric quantification of static callus parameters (cartilage and mineralized area per total area) in the same mice. The different timepoints were evaluated independently and compared by unpaired Student's t test.

(C) Representative callus images and histomorphometric measurement of osteoclast parameters in TRAP-stained callus sections in reboxetine- and vehicle-treated mice 21 days following the femoral osteotomy. Scale bar = 50  $\mu$ m.

(D) Representative images and histomorphometric assessment of osteoblast numbers and surface in toluidine blue-stained callus sections. Osteoblasts are indicated by black arrows. Scale bar = 25  $\mu$ m. n = 6 mice per group. Unpaired Student's t test, data are shown in boxplots with median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quantiles. Whiskers indicate upper and lower extremes, respectively.



**Figure 5. Reboxetine improves late-stage fracture healing**

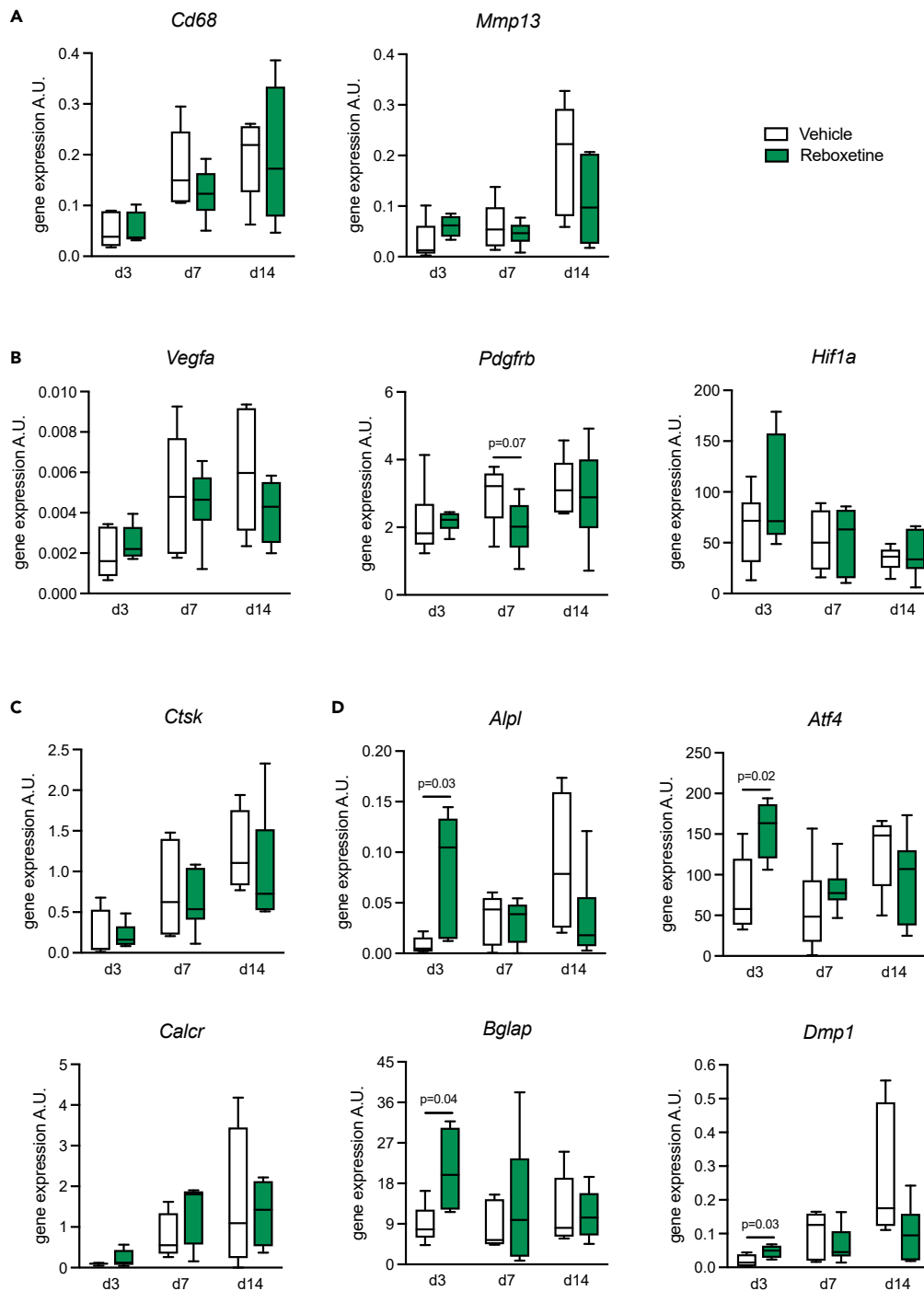
(A and B) (A) Representative  $\mu$ CT images of the healing femur of reboxetine- and vehicle-treated mice 28 days after osteotomy and (B) radiologic assessment of structural callus parameters (BV = bone volume; TV = tissue volume).

(C) Exemplary callus images ( $\mu$ CT images) representing complete union (top) or non-union (bottom), and semiquantitative evaluation of osseous callus bridging in reboxetine- and vehicle-treated mice 28 days after osteotomy: complete bridging = all four cortices bridged by callus, partial bridging = two to three cortices bridged by callus, incomplete bridging = callus present, but no bridging visible, and non-union = rounded cortices, minimal presence of callus.

(D) Quantification of mechanical properties of the healing femora as determined by 3-point bending in the same animals.  $F_{break}$  = maximum force that the bone could withstand;  $W_{ust}$  = work to ultimate tensile strength.  $n = 6$  mice per group. Unpaired Student's t test, data are shown in boxplots with median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quantiles. Whiskers indicate upper and lower extremes, respectively.

parameters, while trabecular bone cell parameters in the distal femur remained unaltered. In the midshaft area of the femur, reboxetine did not change indices of cortical bone resorption including cortical porosity and osteoclast numbers. However, we found reboxetine to increase the cortical thickness of the femur, which was accompanied by elevated osteoblast numbers. This contrasts with the study by Ma et al. and is possibly explained by the fact that the authors employed continuous release of reboxetine, while our study relied on daily injections. Also, it is possible that the fracture itself primes the non-fractured skeleton to a different response to NET inhibition, as Ma et al. studied mice without fractures. Together, these observations, however, indicate that during fracture healing reboxetine treatment once daily exerts a site-specific effect on bone remodeling in the non-fractured skeleton, with catabolic action in trabecular bone and anabolic impact on cortical bone. This is of special clinical relevance, as total disruption and subsequent healing of cortical bone is central to any skeletal fracture.

Although expression of NET, the principal target of reboxetine, was previously demonstrated in osteoblasts, trabecular and cortical bone, a possible role in bone regeneration was unknown. We thus analyzed NET expression in the callus during fracture healing, where we observed a progressive and striking induction of NET following a femoral osteotomy. As periosteal cells migrate into the site of skeletal injury and differentiate into bone-forming osteoblasts, we also monitored NET expression in periosteal cells generated *ex vivo*. Here, NET expression also progressively increased during osteogenic differentiation of periosteal cells, suggesting a functional relevance during long bone healing. During the early and intermediate healing phases (i.e., post-operative day 7–21), reboxetine did not affect any static radiologic and histologic outcome measurements. However, in line with the increased osteoblast numbers in the cortical bone of the contralateral non-fractured femur, reboxetine treatment was associated with increased osteoblast parameters in the callus 21 days following the osteotomy. This finding translated into improved osseous callus bridging and improved biomechanical stability in the reboxetine group 28 days after surgery. On a molecular level, while indices of inflammatory responses and osteoclasts were unaffected, an induced expression of the key osteoblast marker genes *Atf4*, *Bglap* and *Dmp1* was detected at day 3 following osteotomy. In this regard, *Atf4* plays master roles in osteoblast proliferation and differentiation by its transcriptional regulation of key genes involved in bone formation, including *Bglap* encoding osteocalcin. Moreover, *Dmp1* represents a major extracellular matrix protein with essential relevance for osteogenesis. These markers were induced at a very early healing stage, subsequently normalized, and even decreased by tendency at later stages, pointing toward an overall accelerated healing course in mice receiving reboxetine. Together, our findings suggest that osteogenesis is enhanced by reboxetine treatment at very early stages on a transcriptional level, resulting in increased cellular osteoblast parameters at intermediate stages and improved healing outcomes at later stages.



**Figure 6. Reboxetine induces the expression of osteoblast markers in the early healing stage**

(A–D) qRT-PCR expression analysis (virtual copy numbers per Gapdh; A.U. = arbitrary units) of the indicated genes in the callus of reboxetine- or vehicle-treated mice at the indicated time points after osteotomy. *Cd68* = cluster of differentiation 68; *MMP13* = matrix metalloproteinase 13; *Vegfa* = vascular endothelial growth factor A; *Pdgfrb* = platelet-derived growth factor receptor beta; *Hif1a* = hypoxia inducible factor 1 subunit alpha; *Ctsk* = cathepsin K; *Calcr* = calcitonin receptor; *Alpl* = alkaline phosphatase; *Atf4* = activating transcription factor 4; *Bglap* = bone gla protein, alternatively termed osteocalcin; *Dmp1* = dentin matrix protein 1. n = 6 mice per group. Non-parametric Mann–Whitney U test, data are shown in boxplots with median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quantiles. Whiskers indicate upper and lower extremes, respectively.

To the best of our knowledge, no clinical data describing the effects of SNRI on fracture healing is currently available. Over the last decades, various studies provided evidence for increased fracture risk upon use of SNRI. A nationwide Chinese case-control study reported an adjusted odds ratio of 1.16 for fracture risk in SNRI users.<sup>16</sup> Furthermore, an adjusted hazard ratio of 1.68 for fracture risk in patients using SNRI was observed in a prospective Canadian trial.<sup>13</sup> In comparison with other antidepressant drugs, such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), a retrospective US-American trial showed that fracture risk in patients using SNRI is elevated by tendency.<sup>17</sup> There are several factors contributing to the observed adverse effects concerning the musculoskeletal system. Generally, comorbidities such as a history of falling and osteoporosis are frequent in SNRI users and increase fracture risk independently, as summarized recently in a meta-analysis by Sobieraj et al.<sup>18</sup> In addition, administration of SNRI was reported to lower bone mass at various sites of the skeleton. Results of a population-based cohort study show significantly decreased radial T-scores and a reduction of cortical tibial BMD by -4% upon SNRI use; however, disuse bone wasting due to accompanying reduced physical function in studied elderly women could not be excluded.<sup>19</sup> In line with these findings, however, increased bone resorption activity, as indicated by elevation of serum  $\beta$ -CTX levels, has overall been observed in patients using SNRI.<sup>20</sup> Thus, although currently available evidence is suggesting an increased fracture risk due to enhanced bone resorption associated with SNRI use, further clinical studies are warranted to also examine its impact on bone healing.

In conclusion, our study shows that reboxetine exerts site-specific effects in the non-fractured skeleton, with anabolic action in femoral cortical bone. Furthermore, our results demonstrate that a systemic, pharmacologic inhibition of NET does not impair femoral bone healing at early and intermediate healing stages in mice, and even results in improved healing outcomes at late stages. Although caution must be taken when translating these findings into the clinical situation, our data imply that patients taking SNRI are not at risk for impaired fracture healing. Contrary to the current understanding of NE as a catabolic mediator in bone, our study results indicate that NE signaling can exert anabolic actions on the fractured and non-fractured skeleton in a context dependent manner.

### Limitations of the study

Our study has several limitations. First, we only employed female mice to allow better comparability with similar studies investigating bone remodeling and regeneration. Thus, it is possible that male mice respond differently to reboxetine treatment during fracture healing. Second, we cannot define to which degree NET inhibition occurred with the chosen pharmacologic approach, as we did not determine systemic or local NE levels within the fracture callus. Yet, based on the observed skeletal effects in non-fractured, trabecular bone, which are similar to that of Ma et al., we conclude that NE inhibition by reboxetine was effective in our chosen model. Third, to allow better comparability with previous studies, mice received the osteotomy at the age of 12–14 weeks, and reboxetine treatment was initiated at the time of surgery. Administration of SNRIs before this age, especially in female mice, would be similar to administration of SNRIs in adolescents, who have a different metabolism of neurotransmitters, including NA, extremely high neuronal plasticity, and premature anatomical structures that are still subject to change.<sup>21–23</sup> And finally, our study does not allow formal conclusions regarding the underlying mechanisms by which reboxetine improves late-stage bone healing. In this regard, systemic application of the SNRI reboxetine results in global inhibition of NET, which is expressed in a broad array of different cell types and organ systems involved in bone repair.<sup>24,25</sup> Inhibition of NET may also affect the signal transduction activities of alpha- and beta-adrenergic cell surface receptors with significant impact on bone cell differentiation and function. Although our data clearly suggest a pro-osteogenic effect of reboxetine during bone regeneration, future studies using cell-type specific NET inactivation are thus warranted to explain how the contrasting impact of reboxetine in trabecular and cortical bone is explained on a mechanistic level, and how this translates into improved late-stage bone healing.

### STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS
  - Animal experiments
  - Materials
  - Surgery and treatment
- METHOD DETAILS
  - Micro-computed tomography
  - Histomorphometry of the callus
  - Histomorphometry of the spine and intact femur
  - Biomechanics
  - Periosteal cell culture

- RNA extraction and qRT-PCR
- ELISA
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107761>.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ms. Cordula Erdmann, Ms. Saskia Schröder and Ms. Mayla Rickert for skillful technical assistance. Graphical abstract and Figure 1C were created with [Biorender.com](https://www.biorender.com). This work was supported by the German Research Foundation [grant numbers KE 2179/2-3 and TS 303/2-3].

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.D. performed experiments, collected and interpreted the data, and edited the manuscript. S.J. and W.X. contributed to surgery, data analysis, and tissue sampling. P.R.K., L.-C.A., J.L.K., J.S., and R.A. assisted with surgery and tissue sampling. T.A.Y. performed biomechanical testing. D.J. and S.T. provided critical discussion. A.B. designed and supervised the study and interpreted the data. J.K. designed and supervised the study, interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

## DECLARATION OF INTERESTS

J.K. and S.T. disclose support for the research of this work from the German Research Foundation [grant numbers KE 2179/2-3 and TS 303/2-3].

Received: April 18, 2023

Revised: August 3, 2023

Accepted: August 25, 2023

Published: August 29, 2023

## REFERENCES

- Westgeest, J., Weber, D., Dulai, S.K., Bergman, J.W., Buckley, R., and Beaupre, L.A. (2016). Factors Associated With Development of Nonunion or Delayed Healing After an Open Long Bone Fracture: A Prospective Cohort Study of 736 Subjects. *J. Orthop. Trauma* 30, 149–155. <https://doi.org/10.1097/jot.0000000000000488>.
- Goudie, E.B., and Robinson, C.M. (2021). Prediction of Nonunion After Nonoperative Treatment of a Proximal Humeral Fracture. *J. Bone Joint Surg. Am.* 103, 668–680. <https://doi.org/10.2106/jbjs.20.01139>.
- Hak, D.J., Fitzpatrick, D., Bishop, J.A., Marsh, J.L., Tilp, S., Schnettler, R., Simpson, H., and Alt, V. (2014). Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* 45, S3. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.04.002>.
- Wichlas, F., Tsitsilonis, S., Disch, A.C., Haas, N.P., Hartmann, C., Graef, F., and Schwabe, P. (2015). Long-term functional outcome and quality of life after successful surgical treatment of tibial nonunions. *Int. Orthop.* 39, 521–525. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2629-y>.
- Tanaka, K., Hirai, T., Kodama, D., Kondo, H., Hamamura, K., and Togari, A. (2016).  $\alpha$ 1B-Adrenoceptor signalling regulates bone formation through the up-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$  expression in osteoblasts. *Br. J. Pharmacol.* 173, 1058–1069. <https://doi.org/10.1111/bph.13418>.
- Ferroni, L., Gardin, C., Bellin, G., Vindigni, V., Pavan, C., and Zavan, B. (2019). Effects of novel antidepressant drugs on mesenchymal stem cell physiology. *Biomed. Pharmacother.* 114, 108853. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108853>.
- Aitken, S.J., Landao-Bassonga, E., Ralston, S.H., and Idris, A.I. (2009). Beta2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation *in vitro* by direct and indirect mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 482, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.11.012>.
- Zhu, Y., Ma, Y., and Elefteriou, F. (2018). Cortical bone is an extraneuronal site of norepinephrine uptake in adult mice. *Bone Rep.* 9, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.11.002>.
- Ma, Y., Krueger, J.J., Redmon, S.N., Uppuganti, S., Nyman, J.S., Hahn, M.K., and Elefteriou, F. (2013). Extracellular norepinephrine clearance by the norepinephrine transporter is required for skeletal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 288, 30105–30113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481309>.
- Sáiz-Ruiz, J., Ibáñez, A., Díaz-Marsá, M., Arias, F., Padín, J., Martín-Carrasco, M., Montes, J.M., Ferrando, L., Carrasco, J.L., Martín-Ballesteros, E., et al. (2002). Efficacy of venlafaxine in major depression resistant to selective serotonin reuptake inhibitors. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 26, 1129–1134. [https://doi.org/10.1016/s0278-5846\(02\)00247-6](https://doi.org/10.1016/s0278-5846(02)00247-6).
- Hollander, E., Friedberg, J., Wasserman, S., Allen, A., Birnbaum, M., and Koran, L.M. (2003). Venlafaxine in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. *J. Clin. Psychiatry* 64, 546–550. <https://doi.org/10.4088/jcp.v64n0508>.
- Chamberlain, S.R., Del Campo, N., Dowson, J., Müller, U., Clark, L., Robbins, T.W., and Sahakian, B.J. (2007). Atomoxetine improved response inhibition in adults with attention deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 62, 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.03.003>.
- Moura, C., Bernatsky, S., Abrahamowicz, M., Papaioannou, A., Bessette, L., Adachi, J., Goltzman, D., Prior, J., Kreiger, N., Towheed, T., et al. (2014). Antidepressant use and 10-year incident fracture risk: the population-based Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMoS). *Osteoporos. Int.* 25, 1473–1481. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2649-x>.
- Bakken, M.S., Engeland, A., Engesaeter, L.B., Ranhoff, A.H., Hunnskaar, S., and Ruths, S. (2013). Increased risk of hip fracture among older people using antidepressant drugs: data from the Norwegian Prescription Database and the Norwegian Hip Fracture Registry. *Age Ageing* 42, 514–520. <https://doi.org/10.1093/ageing/agt009>.
- Pierroz, D.D., Bonnet, N., Bianchi, E.N., Boussein, M.L., Baldock, P.A., Rizzoli, R., and Ferrari, S.L. (2012). Deletion of  $\beta$ -adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1252–1262. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1594>.
- Wang, C.Y., Fu, S.H., Wang, C.L., Chen, P.J., Wu, F.L.L., and Hsiao, F.Y. (2016). Serotonergic antidepressant use and the risk of fracture: a population-based nested

- case-control study. *Osteoporos. Int.* 27, 57–63. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3213-z>.
17. Lanteigne, A., Sheu, Y.H., Stürmer, T., Pate, V., Azrael, D., Swanson, S.A., and Miller, M. (2015). Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor and selective serotonin reuptake inhibitor use and risk of fractures: a new-user cohort study among US adults aged 50 years and older. *CNS Drugs* 29, 245–252. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0231-5>.
  18. Sobieraj, D.M., Martinez, B.K., Hernandez, A.V., Coleman, C.I., Ross, J.S., Berg, K.M., Steffens, D.C., and Baker, W.L. (2019). Adverse Effects of Pharmacologic Treatments of Major Depression in Older Adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* 67, 1571–1581. <https://doi.org/10.1111/jgs.15966>.
  19. Agarwal, S., Germosen, C., Kil, N., Bucovsky, M., Colon, I., Williams, J., Shane, E., and Walker, M.D. (2020). Current anti-depressant use is associated with cortical bone deficits and reduced physical function in elderly women. *Bone* 140, 115552. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115552>.
  20. Shea, M.L.O., Garfield, L.D., Teitelbaum, S., Civitelli, R., Mulsant, B.H., Reynolds, C.F., 3rd, Dixon, D., Doré, P., and Lenze, E.J. (2013). Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor therapy in late-life depression is associated with increased marker of bone resorption. *Osteoporos. Int.* 24, 1741–1749. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2170-z>.
  21. Murrin, L.C., Sanders, J.D., and Bylund, D.B. (2007). Comparison of the maturation of the adrenergic and serotonergic neurotransmitter systems in the brain: implications for differential drug effects on juveniles and adults. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1225–1236. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.028>.
  22. Sanders, J.D., Happe, H.K., Bylund, D.B., and Murrin, L.C. (2011). Changes in postnatal norepinephrine alter alpha-2 adrenergic receptor development. *Neuroscience* 192, 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.045>.
  23. Bradshaw, S.E., Agster, K.L., Waterhouse, B.D., and McGaughy, J.A. (2016). Age-related changes in prefrontal norepinephrine transporter density: The basis for improved cognitive flexibility after low doses of atomoxetine in adolescent rats. *Brain Res.* 1641, 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.001>.
  24. Wong, E.H., Sonders, M.S., Amara, S.G., Tinholt, P.M., Piercey, M.F., Hoffmann, W.P., Hyslop, D.K., Franklin, S., Porsolt, R.D., Bonsignori, A., et al. (2000). Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. *Biol. Psychiatry* 47, 818–829. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(99\)00291-7](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00291-7).
  25. Ayala-Lopez, N., and Watts, S.W. (2021). Physiology and Pharmacology of Neurotransmitter Transporters. *Compr. Physiol.* 11, 2279–2295. <https://doi.org/10.1002/cphy.c200035>.
  26. Jiang, S., Knapstein, P., Donat, A., Tsitsilonis, S., and Keller, J. (2021). An optimized protocol for a standardized, femoral osteotomy model to study fracture healing in mice. *STAR Protoc.* 2, 100798. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100798>.
  27. Dziedzicka-Wasylewska, M., Faron-Górecka, A., Kuśmider, M., Drozdowska, E., Rogóž, Z., Siwanowicz, J., Caron, M.G., and Bönisch, H. (2006). Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. *Neuropsychopharmacology* 31, 2424–2432. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301064>.
  28. Cryan, J.F., O’Leary, O.F., Jin, S.H., Friedland, J.C., Ouyang, M., Hirsch, B.R., Page, M.E., Dalvi, A., Thomas, S.A., and Lucki, I. (2004). Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8186–8191. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401080101>.
  29. Boussein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Goldberg, R.E., Jepsen, K.J., and Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 25, 1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>.
  30. Kawamoto, T., and Kawamoto, K. (2014). Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamoto’s film method (2012). *Methods Mol. Biol.* 1130, 149–164. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-989-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-989-5_11).
  31. Appelt, J., Tsitsilonis, S., Otto, E., Jahn, D., Köhli, P., Baranowsky, A., Jiang, S., Fuchs, M., Bucher, C.H., Duda, G.N., et al. (2021). Mice Lacking the Calcitonin Receptor Do Not Display Improved Bone Healing. *Cells* 10, 2304. <https://doi.org/10.3390/cells10092304>.
  32. Miao, D., and Scutt, A. (2002). Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 333–340. <https://doi.org/10.1177/002215540205000305>.
  33. Schinke, T., Schilling, A.F., Baranowsky, A., Seitz, S., Marshall, R.P., Linn, T., Blaeker, M., Huebner, A.K., Schulz, A., Simon, R., et al. (2009). Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. *Nat. Med.* 15, 674–681. <https://doi.org/10.1038/nm.1963>.
  34. Hahn, M., Vogel, M., and Delling, G. (1991). Undecalcified preparation of bone tissue: report of technical experience and development of new methods. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 418, 1–7. <https://doi.org/10.1007/bf01600238>.
  35. Keller, J., Catala-Lehnen, P., Huebner, A.K., Jeschke, A., Heckt, T., Lueth, A., Krause, M., Koehne, T., Albers, J., Schulze, J., et al. (2014). Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat. Commun.* 5, 5215. <https://doi.org/10.1038/ncomms6215>.
  36. Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., and Parfitt, A.M. (2013). Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2–17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>.
  37. Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., and Recker, R.R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 2, 595–610. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>.
  38. Savi, F.M., Lawrence, F., Huttmacher, D.W., Woodruff, M.A., Bray, L.J., and Wille, M.L. (2019). Histomorphometric Evaluation of Critical-Sized Bone Defects Using Osteomeasure and Aperio Image Analysis Systems. *Tissue Eng. Part C Methods* 25, 732–741. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2019.0179>.
  39. Luther, J., Yorgan, T.A., Rolvien, T., Ulsamer, L., Koehne, T., Liao, N., Keller, D., Vollersen, N., Teufel, S., Neven, M., et al. (2018). Wnt1 is an Lrp5-independent bone-anabolic Wnt ligand. *Sci. Transl. Med.* 10, eaau7137. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau7137>.

## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
Reboxetine mesylate	AdooQ BioScience	Cat#A11919; CAS: 98769-84-7
Clindamycin	Hikma Pharma	Cat#42482.01.00
Burprenorphine	Richter Pharma	Cvet code: QN02AE01
Metamizole	Ratiopharm	PZN 03530394; EAN 4150035303945
<b>Critical commercial assays</b>		
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel	Cat#740955.50
ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs	Cat#E6300L
Norepinephrine High Sensitive ELISA	Immumol	Cat#BA-E-5200R
<b>Experimental models: Organisms/strains</b>		
C57BL/6J mice	The Jackson Laboratory	Cat#000664
<b>Oligonucleotides</b>		
Primers for SYBR Green: <i>Gapdh</i> (FOR-TGCACCAACTGCTTAG, REV-GGATGCAGGGATGATGTTCC) <i>Pdgfrb</i> (FOR-AGTGAGGACAGACGTCCTCAT, REV-GAGGTGGTAATCCCGTCAGC) <i>Slc6a2</i> (FOR-TGTGTTTGTACGCCAGGTG, REV-ACCTCCTAGCACCTTCGTGA)	This paper	N/A
TaqMan Primer ( <i>Alpl</i> , <i>Atf4</i> , <i>Bglap</i> , <i>Calcr</i> , <i>Cd68</i> , <i>Ctsk</i> , <i>Dmp1</i> , <i>Gapdh</i> , <i>Hif1a</i> , <i>MMP13</i> , <i>Ucp1</i> )	ThermoFischer	Cat#4331182; Assay-IDs available in manuscript
<b>Software and algorithms</b>		
GraphPad PRISM	Graphpad Software, Inc.	N/A
ImageJ Analysis System	NIH	<a href="https://imagej.net/ij/index.html">https://imagej.net/ij/index.html</a>
OsteoMeasure	Osteometrics Inc.	N/A
<b>Other</b>		
MouseExFix simple	RISystem	Cat#RIS.611.200
MouseExFix Mounting Pin 0.45 mm	RISystem	Cat#RIS.411.100
Square box wrench 0.70 mm	RISystem	Cat#RIS.590.112
Drill bit 0.45 mm	RISystem	Cat#RIS.590.201
Gigli wire saw 0.7mm	RISystem	Cat#RIS.590.120-25
Hand drill	RISystem	Cat#RIS.390.XXX
Mersilene	Ethicon	Cat#eh7147h

### RESOURCE AVAILABILITY

#### Lead contact

Further information and requests concerning resources and reagents should be directed to and will be answered by the lead contact, Prof. Dr. Dr. Johannes Keller ([j.keller@uke.de](mailto:j.keller@uke.de)).

#### Materials availability

This study did not generate new unique reagents.



### Data and code availability

- All relevant data of this project is presented within the figures of this manuscript. Research raw data associated with this manuscript will be shared by the [lead contact](#) upon reasonable request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

## EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

### Animal experiments

Female wild-type (WT) mice with a C57Bl/6J genetic background and body weight > 20 g were used for the study. All experiments were carried out according to the international directives on the protection of laboratory animals (Directive 2010/63/EU) and are in line with the ARRIVE guidelines for animal studies. The study was approved by animal facility of the University Hospital Hamburg-Eppendorf and the local animal welfare authorities (No. N124/2020, Behörde für Justiz und Verbraucherschutz, Freie und Hansestadt Hamburg, Germany) prior to project start. Animals were maintained under standard conditions (12 h light-dark circadian rhythm, 22°C room temperature) in a SPF facility. They were housed in stable groups of two to three animals per cage. Water and a standard diet were provided *ad libitum*.

### Materials

The following substances were used for animal experiments: Reboxetine mesylate (AdooQ BioScience, Irvine, Canada), clindamycin (Hikma Pharma GmbH, Martinsried, Germany), buprenorphine (Buprenovet®, Richter Pharma AG, Wels, Austria), metamizole (Novaminsulfon-ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Germany).

### Surgery and treatment

At the age of 12-14 weeks, the mice received a femoral fracture, stabilized by an external fixator, as previously described.<sup>26</sup> In brief, the mice were anesthetized, and the left femur was exposed. Four pins were drilled with a hand-drill (diameter: 0.45 mm) and a commercially available external fixator (RISystem, Davos, Switzerland) was installed on the femur. The fracture gap was generated using a Gigli wire saw with a diameter of 0.7 mm. Wound closure was accomplished using a simple interrupted suture. Clindamycin (150 mg·kg<sup>-1</sup>) and buprenorphine (0.1 mg·kg<sup>-1</sup>) were administered prior to surgery. For optimal pain relief, metamizole (1 mg·ml<sup>-1</sup>) was administered via the drinking water for 3 days post-operatively. From the timepoint of surgery until sacrifice, the mice received daily injections of either vehicle (0.9% saline) or the selective norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) reboxetine at 15 mg·kg<sup>-1</sup>, diluted in 0.9% saline, with a total volume of 100 µl intraperitoneally. The dosage lies within the therapeutic range of 5-20 mg·kg<sup>-1</sup> and has been used in several previous studies without report of adverse effects.<sup>27,28</sup> Littermates were assigned randomly to experimental groups and sacrificed on post-operative days 3, 7, 14, 21 and 28 by final exsanguination under isoflurane anesthesia and samples were collected subsequently.

## METHOD DETAILS

### Micro-computed tomography

The fractured and contralateral femur as well as the spine (L1-L4) were scanned using µCT (VivaCT 80, SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) at voxel resolution of 15.6 µm, 400 ms integration time, 70 kVp and 113 µA. For evaluation of the callus, the volume of interest (VOI) was determined by the cortical composition of the fracture ends and a total of 100 slides was contoured manually. Data is displayed as suggested by the American Society for Bone and Mineral Research guidelines for µCT analysis.<sup>29</sup> For evaluation of the contralateral femur, the whole femur was scanned and a 2 mm long midshaft area as well as a 2 mm long distal segment were calculated accordingly. Cortical and trabecular properties were derived through an automatic image analysis algorithm provided by the manufacturer. For evaluation of the spine, a total of four vertebrae were scanned, the trabecular bone of the two middle vertebra bodies was analyzed semi-automatically and the mean values were calculated. On each anatomical site, a consistent threshold was used. For the assessment of late-stage callus bridging, fractured femurs were collected at day 28 after surgery and underwent fixation with 4% paraformaldehyde at 4°C for 24 h. Afterwards, the fixators were removed, and the bones were stored in PBS during µCT scanning. Callus bridging of these samples was evaluated by two blinded researchers on three-dimensional images and categorized with the following scoring system: complete bridging = all four cortices bridged by callus, partial bridging = two or three cortices bridged by callus, incomplete bridging = callus present, but no bridging visible, and non-union = rounded cortices, minimal presence of callus.

### Histomorphometry of the callus

Whole femurs were dissected on day 7, 14 and 21 after surgery and fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C. After 24 h, the femurs were washed with PBS three times for an hour each. Subsequently, the fixators were removed carefully, and the bones were scanned using µCT. After incubation in an ascending sugar gradient (10%, 20% and 30% each for 24 h at 4°C), the samples were embedded in SCEM medium (Section Lab Co Ltd., Hiroshima, Japan), frozen in hexane (Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe, Germany) and stored at -80°C until further processing. Using a cryostat (Leica CM3050S, Leica Microsystems, Nussloch, Germany) with a microtome blade for hard tissue sectioning (Type N35HR, FEATHER Safety Razor Co., Osaka, Japan), longitudinal sections of 7 µm were derived and mounted onto microscope slides

using cryofilm (Cryofilm type II C, Section Lab Co Ltd., Hiroshima, Japan) as described by Kawamoto and Kawamoto in 2014.<sup>30</sup> Stained was performed subsequently, employing either Movat's Pentachrome protocol to estimate the ratio of cartilage and mineralized area or histochemical detection of Alpl activity using Naphthol (Naphthol AS-MX phosphate disodium salt, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany). Staining with Movat's Pentachrome was performed as described elsewhere.<sup>31</sup> The distribution of cartilage and mineralization within the callus area was calculated semi-automatically using image analysis software (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, MD, USA). For alkaline phosphatase (Alpl) activity staining, cryo-sections were defrosted and washed with tris buffer (0,1M tris maleate buffer at pH 9.2 with 1% magnesium chloride) at room temperature two times for 5 minutes each. Staining with Naphthol was performed as previously described<sup>32</sup> and coverslips mounted with glycerin gelatine (Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe, Germany). Signal intensities in the ROI of the healing fracture (1 mm x 2 mm square placed centrally over the fracture gap) were quantified by two blinded investigators using ImageJ Analysis System (NIH, Bethesda, MD, USA).

### Histomorphometry of the spine and intact femur

After fixation of the whole skeleton in 4% formaldehyde for 48 h, vertebra bodies L1-L4 and the contralateral, non-fractured femur were dissected, dehydrated, and embedded undecalcified in methylmetacrylate as previously described.<sup>33</sup> 4  $\mu$ m sections of the spine and the femur, respectively, were cut using a Microtec rotation microtome. Toluidine blue, von Kossa/van Gieson and TRAP staining was performed as described elsewhere.<sup>34,35</sup> In line with ASMBR recommendations,<sup>36,37</sup> osteoclast numbers per bone surface and osteoclast surface were evaluated by counting TRAP-positive, multinucleated cells on the bone surface on the respective slides. Osteoblast numbers per bone surface and osteoblast surface were evaluated by counting grouped cuboidal cells, located along the bone surface, on Toluidine blue stained sections. Osteocyte numbers per bone area were evaluated by counting bone cells embedded in ellipsoidal cavities within the collagenous extracellular matrix on Toluidine blue stained sections. In addition, manual delineation of the bone surface was performed on the same sections using the OsteoMeasure histomorphometry system (Osteometrics Inc., Atlanta, USA) with 20-fold magnification and manual, region-based selection mode.<sup>38</sup> Subsequently, static and dynamic parameters were calculated semi-automatically by the software on a field-by-field summary basis.

### Biomechanics

Following  $\mu$ CT evaluation, all bones harvested on day 28 were challenged with a destructive three-point bending test as previously described.<sup>39</sup> In short, femurs were placed on two support bars of the device (ZwickRoell, Ulm, Germany) and a bending load with a maximum of 20 N was applied medially onto the callus site. Derived parameters were calculated automatically by the software.

### Periosteal cell culture

Femurs of euthanized C57Bl/6J WT mice of both genders were harvested at the age of 12-20 weeks, cut open and flushed out several times to remove bone (osteoblasts, osteoclasts) and bone marrow cells. Digestion of periosteal tissue was then induced by incubation with 0.1% dispase (Roche Diagnostics GmbH, Darmstadt, Germany) and 0.25% collagenase II (gibco Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) at 37°C for 3 h. Periosteal cells were separated using a 70  $\mu$ m cell strainer and centrifugation at 1000 RPM for 10 minutes. Subsequently, cells were counted manually and plated onto a 12-well plate in a concentration of  $1 \times 10^4$  cells per well.  $\alpha$ -MEM (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% FCS was used for cultivation and changed every 2-3 days. Osteogenic differentiation was induced with 25  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> ascorbic acid and 5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\beta$ -glycerophosphate. On day 0, 4, 9, 15 and 22 after induction of differentiation, cells were lysed in TRIzol (TRI Reagent, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) and RNA isolation and gene expression analysis was carried out as described below.

### RNA extraction and qRT-PCR

The callus, including both fracture ends, was extracted between the two central pins at day 3, 7 and 14 after surgery. Concomitantly, midshaft femoral sections of an independent group of WT mice (C57Bl/6J genetic background, n = 6 females, 14 weeks old) were dissected 3 days following sham surgery and served as controls (intact bone; data exclusively displayed in Figure 1A). Following snap freezing in liquid nitrogen, further processing was carried out using a standardized purification protocol employing homogenization in TRIzol (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) with an Ultra Turrax (IKA Labortechnik, Staufen, Germany). The total RNA of callus and midshaft samples and periosteal cell suspensions was isolated using columns of a NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Concentration and quality of the derived RNA was monitored by using NanoDrop 2000 system (NanoDrop Technology). Reverse transcription into cDNA was performed using a cDNA synthesis kit (ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR was conducted using TaqMan Assay-on-Demand primer sets (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) or Power SYBR Green PCR Master Mix (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). Primers used for TaqMan included the following: *Alpl* (Mm00475834\_m1), *Atf4* (Mm00515325\_g1), *Bglap* (Mm03413826\_mH), *Calcr* (Mm00432271\_m1), *Cd68* (Mm03047342\_m1), *Ctsk* (Mm00484039\_m1), *Dmp1* (Mm01208363\_m1), *Gapdh* (Mm99999915\_g1), *Hif1a* (Mm00468869\_m1), *Mmp13* (Mm00439491\_m1), *Ucp1* (Mm01244861\_m1), *Vegfa* (Mm00437306\_m1). Primers for SYBR Green were designed as follows: *Gapdh* (FOR-TGCACCACTGCTTAG, REV-GGATGCAGGGATGATGTTT), *Pdgfrb* (FOR-AGTGA GGACAGACGTCCCAT, REV-GAGGTGGTAATCCCGTCAGC), *Slc6a2* (FOR-TGTGTTGTACGCCAGGTG, REV-ACCTCTAGCACCTT

CGTGA). For all groups, values are displayed as expression over the housekeeping gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) as a reference. The  $\Delta\Delta\text{CT}$  method was used for relative quantification.

### ELISA

Serum NE levels were measured by ELISA (BA-E-5200R, Immusmol, Bordeaux, France) according to the manufacturer's protocol.

### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

The sample size was calculated for the main outcome parameter callus mineral content derived by  $\mu\text{CT}$  analysis, yielding a minimum required number of  $n = 5$  mice per group. To account for occasional loss of samples after surgery (e.g., dislocation of fracture fixation) or histologic processing (overall not encountered in this study), group size was increased to  $n = 6$  per group and time point for all *in vivo* assays. For *in vitro* studies,  $n = 6$  independent cell cultures were employed. All groups were assigned randomly, and researchers were blinded during sample processing and analyses of outcome measurements. Unpaired two-tailed Students t-Test was used to determine differences between reboxetine and vehicle groups in  $\mu\text{CT}$ , histomorphometry, and biomechanical analysis. Non-parametric Mann-Whitney U test was used to analyze gene expression. Results are displayed as box plots with median value and minimum and maximum whiskers. All statistical details of the experiments can be found in the figure legends. At  $p < 0.05$ , differences were considered statistically significant (GraphPad Prism 6, La Jolla, CA, USA).

## Zusammenfassende Darstellung

### Einleitung

Knochen bildet zusammen mit Muskeln, Sehnen und Gelenken den Stützapparat unseres Körpers und erfüllt eine Vielzahl an Funktionen, darunter neben der Fortbewegung auch den Schutz innerer Organe. Das Knochengewebe unterliegt stetigen Umbauprozessen, dem sogenannten „bone remodeling“, welche auf einer ausgewogenen Aktivität von knochenbildenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten beruhen und sowohl die Qualität als auch die Beständigkeit der Knochenmasse sicherstellen. Knochengewebe zeichnet sich trotz einer gewissen Elastizität durch eine hohe Stabilität sowie Biege- und Torsionssteifigkeit aus. Bei sehr hoher mechanischer Beanspruchung oder einem pathologisch veränderten Knochenmetabolismus, wie beispielsweise einer postmenopausalen Osteoporose, kann es dennoch zu Frakturen kommen. Auch Medikamente können den Knochenstoffwechsel negativ beeinflussen und somit zu einem höheren Frakturrisiko oder einem prolongierten Heilungsverlauf nach Fraktur führen.

Die Frakturheilung langer Röhrenknochen gliedert sich in drei Phasen: die akute Entzündungsphase mit Ausbildung eines Frakturhämatoms, die Granulationsphase, in der durch Einwanderung von Fibroblasten ein weicher Kallus gebildet wird und die Kallushärtungsphase, in welcher der Kallus über kartilaginäre und knöcherne Umbauprozesse letztendlich ausmineralisiert und an Stabilität gewinnt. Beim Menschen ist die Frakturheilung nach maximal sechs Monaten vollständig abgeschlossen. Kommt es jedoch zu einer unzureichenden Stabilisierung der Fraktur, einer Infektion der betroffenen Stelle oder liegen Risikofaktoren vor, wie beispielsweise die systemische Einwirkung von Noxen, insbesondere Rauchen, kann sich die Frakturheilung verzögern oder ganz ausbleiben<sup>1</sup>. Bei fehlender Konsolidierung im Bereich der Fraktur spricht man nach sechs bis acht Monaten von der Bildung sogenannter Pseudarthrosen. Diese treten auch bei optimaler Versorgung in circa 10-15% der Fälle auf<sup>2</sup> und lassen sich in atrophe und hypertrophe Pseudarthrosen einteilen. Atrophe Pseudarthrosen sind durch eine mangelhafte Blutversorgung und fehlende Kallusmineralisierung gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu sind die häufigeren, hypertrophen bzw. vitalen Pseudarthrosen durch einen hohen Ossifikationsgrad, jedoch fehlende Stabilität charakterisiert. Beide Kategorien können zu gravierenden Problemen in der Behandlung führen: häufig sind Pseudarthrosen mit multiplen Revisionsoperationen, prolongierten Krankenhausaufenthalten sowie Immobilität und einer Minderung der Lebensqualität verbunden, unter der die betroffenen Patient:innen leiden<sup>3</sup>. Die Identifikation von Faktoren, welche den Heilungsprozess von Frakturen positiv oder negativ beeinflussen, ist somit von großem klinischem und wissenschaftlichem Interesse.

Das Katecholamin Noradrenalin, auch als Norepinephrin bezeichnet, stellt neben seiner Bedeutung als Stresshormon einen der wichtigsten Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems dar. Es wird im zentralen Nervensystem im Nucleus caeruleus sowie in der Peripherie im Nebennierenmark von chromaffinen Zellen gebildet. Während die hormonelle Wirkung von Noradrenalin als Vasokonstriktor insbesondere in Stresssituationen von Bedeutung ist, wird Noradrenalin auch unter

physiologischen Bedingungen im zentralen und peripheren sympathischen Nervensystem gebildet und fungiert dort als Neurotransmitter in der Übertragung wichtiger biologischer Signale. Vor diesem Hintergrund ist auch die Interaktion von sympathischem Nervensystem und Knochenzellen in den letzten Jahren in den Fokus vieler Forschungsvorhaben gerückt, da Knochengewebe dicht von sympathischen Nervenfasern innerviert wird und diese den konstanten Umbauprozess des Knochens regulieren. Vorherige Studien konnten zeigen, dass die Ausschüttung von Noradrenalin im Knochengewebe über eine Aktivierung von beta-2 Adrenozeptoren zu einer Hemmung der Aktivität knochenbildender Osteoblasten führt<sup>4</sup>. Gleichzeitig werden Osteoklasten über RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa Beta Ligand) aktiviert, sodass in Folge eine erhöhte Knochenresorption mit Knochenmasseverlust eintritt<sup>5,6</sup>. Darüber hinaus exprimieren Osteoblasten und Osteozyten auf ihrer Zelloberfläche den Noradrenalin-Transporter (NET)<sup>4,7</sup>, welcher für die Wiederaufnahme sezernierten Noradrenalins von Bedeutung ist und den Angriffspunkt verschiedener Psychopharmaka darstellt. Somit stellt sich die klinisch relevante Frage, ob die Behandlung mit NET-hemmenden Psychopharmaka einen unabhängigen Risikofaktor für einen prolongierten Heilungsverlauf von Patient:innen mit Frakturen darstellt.

Bisherige Publikationen liefern bezüglich der Auswirkungen von Psychopharmaka auf den Knochenmetabolismus bzw. die Frakturheilung ein heterogenes Bild, welches durch die überwiegende Durchführung klinisch retrospektiver Studien mit folglich limitierter Aussagekraft charakterisiert ist. Einige Kohortenstudien berichten, dass sich insbesondere Psychopharmaka, welche die Wiederaufnahme von Noradrenalin hemmen, negativ auf den Knochenmetabolismus auswirken können und im gesunden Knochen zu einem Knochenmasseverlust führen<sup>8,9</sup>. Darüber hinaus führte im Mausmodell sowohl die genetische Ablation von NET als auch die Behandlung mit dem selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) Reboxetin zu einem Knochenmasseverlust in der Wirbelsäule<sup>7</sup>. Dementsprechend wurde die folgende Arbeitshypothese aufgestellt: SNRIs beeinflussen die Frakturheilung negativ und Patient:innen, welche mit SNRIs behandelt werden und eine Fraktur erleiden, weisen ein höheres Risiko der Ausbildung von Pseudarthrosen auf. Die Fragestellung wurde im Mausmodell unter Verwendung eines standardisierten Frakturmodells mit Anlage eines externen Fixateurs<sup>10</sup> und Behandlung mit dem SNRI Reboxetin untersucht. Hierbei wurde den Tieren nach Osteotomie im Alter von 12-14 Wochen täglich Reboxetin bzw. Kochsalzlösung als Vehikel intraperitoneal injiziert. Die Aufarbeitung erfolgte zu frühen, intermediären und späten Zeitpunkten zwischen dem dritten und 28. Tag postoperativ, um sowohl Effekte auf die akute Entzündungsphase als auch die Mineralisierung und Stabilität des Kallus zu evaluieren.

## Ergebnisse

### 1. Überexpression von NET während der Frakturheilung

Der Wirkmechanismus von Reboxetin besteht aus einer spezifischen Blockade des Noradrenalin-Transporters, welcher von dem Gen *Slc6a2* (Solute Carrier Family 6 Member 2) transkribiert wird. In der Genexpressionsanalyse von nicht-frakturierten und frakturierten Femora einer Kontrollgruppe ließ sich eine Überexpression von *Slc6a2 in vivo* nachweisen, welche über den Verlauf der Frakturheilung bis zum 21.

Tag postoperativ stetig stieg. Ebenso zeigte sich *in vitro* in periostalen Zellen, die in der Frakturheilung eine entscheidende Rolle spielen, eine erhöhte Expression von *Slc6a2* während der osteogenen Differenzierung. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf eine möglicherweise entscheidende Rolle von noradrenergem Signaling in der Frakturheilung.

## 2. Die Behandlung mit Reboxetin wirkt lokal unterschiedlich auf den intakten Knochen

In der histomorphometrischen Untersuchung der Wirbelsäule wurde an Tag 21 in der Reboxetin-Gruppe eine verringerte trabekuläre Knochenmasse nachgewiesen, welche mit einem Anstieg der Anzahl knochenabbauender Osteoklasten einherging, während die Anzahl an Osteoblasten zwischen Behandlungs- und Vehikelgruppe keine Unterschiede aufwies. Die Analyse des kontralateralen, intakten Femurs zeigte im trabekulären Knochen beider Gruppen keine Unterschiede bezüglich der Knochenmasse. Die kortikale Dicke des distalen Femurs nahm unter Reboxetin-Behandlung jedoch zu und war mit einer erhöhten Anzahl knochenbildender Osteoblasten assoziiert. Somit konnten ein variabler, von der Lokalisation abhängiger Effekt einer längerfristigen Behandlung mit Reboxetin auf den intakten Knochen nachgewiesen werden.

## 3. Frühe und intermediäre Phasen der Frakturheilung werden durch Reboxetin nicht negativ beeinflusst

Die Analyse des frakturierten Femurs mittels  $\mu$ CT und Histologie ergab 7, 14 und 21 Tage nach der Osteotomie keine Unterschiede bezüglich des Mineralisierungsgrades und des Knorpelanteils des Kallus. Die Analyse zellulärer Parameter zeigte an Tag 21 zwischen den Gruppen keine Unterschiede in der Anzahl der Osteoklasten. Im Kallus der Reboxetin-Gruppe konnten jedoch eine höhere Anzahl an Osteoblasten nachgewiesen werden. Es lässt sich folglich ableiten, dass die Behandlung mit Reboxetin die Frakturheilung in dem gewählten experimentellen Setting nicht negativ beeinflusste.

## 4. Reboxetin verbessert die späte Frakturheilung und erhöht die mechanische Stabilität des Kallus

Die Untersuchung später Phasen der Frakturheilung mittels Bridging-Scores zeigte an Tag 28 postoperativ eine verbesserte knöcherne Überbrückung des Frakturspaltes in der Reboxetin-Gruppe. Während über 80% der Tiere in der Behandlungsgruppe eine vollständige Überbrückung aufwiesen, waren es in der Vehikel-Gruppe nur zwei Drittel aller Tiere. Die Testung biomechanischer Eigenschaften ergab zudem eine höhere Stabilität der frakturierten Femora der Behandlungsgruppe, sodass sich eine Wirkung von Reboxetin erst in der späten Phase der Frakturheilung zeigt und hier möglicherweise zur Verbesserung der Knochenregeneration beiträgt.

## 5. Reboxetin führt zu einer Überexpression von Osteoblastenmarkern in der frühen Phase der Frakturheilung

In der Genexpressionsanalyse des Kallus zeigten sich bezüglich Angiogenese, Inflammationsmarkern sowie Osteoklastenmarkern zwischen den Gruppen keine

Unterschiede. Die Expression der Osteoblastenmarker Alkaline Phosphatase (*Alpl*), Activating Transcription Factor 4 (*Atf4*), Osteocalcin (*Bglap*) und Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1 (*Dmp1*) war in der Behandlungsgruppe drei Tage nach der Osteotomie erhöht, normalisierte sich im Verlauf der Frakturheilung und sank an Tag 14 im Vergleich zur Vehikelgruppe ab. Die Überexpression dieser Gene indiziert eine höhere Osteoblastenaktivität und Kallusmineralisierung in den frühen Phasen der Frakturheilung. Kumulativ ergaben sich somit weitere Hinweise auf einen beschleunigten Heilungsprozess unter Reboxetin-Behandlung.

## Diskussion

Die Ergebnisse der Studie lieferten keinen Anhalt für negative Auswirkungen der Behandlung mit dem SNRI Reboxetin auf die Knochenregeneration im murinen Frakturmodell. Zusammen mit der nachgewiesenen höheren Kallusstabilität in der späten Phase der Frakturheilung sowie einer verbesserten knöchernen Frakturüberbrückung unter Reboxetin-Behandlung konnte die Arbeitshypothese unter den angewendeten Bedingungen verworfen werden. Zudem konnte erstmalig eine Überexpression von NET während der Frakturheilung nachgewiesen werden, welche den osteoanabolen Einfluss der Behandlung mit Reboxetin auf die Frakturheilung erklären könnte. Darüber hinaus lieferte die molekulargenetische Analyse der frakturierten Femora Hinweise auf eine vermehrte Expression von Osteoblastenmarkern zu den frühen Zeitpunkten der Frakturheilung. So war *Alpl* drei Tage nach der Osteotomie signifikant erhöht, was auf die Bereitstellung von anorganischem Phosphat und der Bildung von Hydroxylapatit mit folglich erhöhter Mineralisierungsrate schließen lässt. Des Weiteren konnte eine Überexpression von *Atf4* am dritten Tag postoperativ nachgewiesen werden, was für erhöhte Transkription weiterer osteoanaboler Gene sowie die Synthese von Kollagen Typ 1 spricht. Auch das Knochenprotein Osteocalcin, codiert durch *Bglap*, wurde in der Behandlungsgruppe am dritten Tag stärker exprimiert, wodurch im Kallus mehr Calcium und Hydroxylapatit gebunden werden kann. Ebenso konnte eine erhöhte Genexpression von *Dmp1* nachgewiesen werden, was eine hohe Aktivität bezüglich der Formation mineralisierter Matrix vermuten lässt. Ähnliche Effekte wurden bereits in einer *in vitro* Studie von Ferroni et al. beschrieben. Hier führte die Behandlung mit dem kombinierten Noradrenalin- und Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Duoxetine während der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zur Überexpression osteogener Marker, darunter Osterix und Osteocalcin<sup>11</sup>. Im Rahmen der durchgeführten Studie ließ sich im zeitlichen Verlauf der Frakturheilung bis zum 14. Tag postoperativ ein Absinken der oben genannten osteoanabolen Marker beobachten, was möglicherweise auf eine Beschleunigung des Heilungsprozesses unter Reboxetin-Behandlung zurückzuführen ist.

Darüber hinaus wurden Hinweise auf lokal unterschiedliche Effekte von Reboxetin auf den intakten Knochen gefunden. So kam es im distalen Femur der Behandlungsgruppe zu einer Zunahme der kortikalen Knochenmasse, welche zuvor unter vergleichbaren Versuchsbedingungen noch nicht beschrieben wurde. Darüber hinaus konnte, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Ma et al.<sup>7</sup>, einen Verlust von trabekulärer Knochenmasse in der Wirbelsäule der gleichen Mäuse nachgewiesen werden.

Neben den zuvor beschriebenen klinischen Hinweisen für einen Knochenmasseverlust unter SNRI-Behandlung wurde zudem in mehreren unabhängigen Kohortenstudien ein gehäuftes Auftreten von Frakturen in Patient:innen, welche mit SNRIs behandelt wurden, beschrieben<sup>12-14</sup>. Unklar bleibt jedoch, inwieweit hier ein Confounder durch verschieden gutes Ansprechen auf die Therapie vorliegt, da einige Patient:innen womöglich trotz Behandlung unter einer stärkeren psychischen Belastung leiden, welche den Knochenmetabolismus indirekt beeinflusst<sup>15</sup>. Ebenso müssen weitere Komorbiditäten, wie beispielsweise ein erhöhtes Sturzrisiko unter der Behandlung mit Duolexetin<sup>16</sup>, beachtet und in der Auswertung berücksichtigt werden, was die Interpretation klinischer Ergebnisse anspruchsvoller und den Vergleich mit Referenzstudien problematisch machen kann.

Abgesehen von den Auswirkungen einer Psychopharmaka-Behandlung auf den Knochenmetabolismus ergeben sich aus den Ergebnissen der durchgeführten Studie weitere klinische Implikationen. Dies gilt insbesondere für Zustände, die mit systemisch erhöhten Noradrenalin-Leveln assoziiert sind, wie beispielsweise bei Schädel-Hirn-Traumata (SHT), chronisch psychosozialem Stress und Tumoren wie dem Phäochromozytom.

Der Zustand nach SHT wurde zuvor bereits klinisch in verschiedenen Studien mit einer reduzierten Knochendichte im intakten Knochen in Verbindung gebracht<sup>17,18</sup>. Auch experimentell konnten diese Effekte im Kleintiermodell reproduziert werden. Hier ließ sich unter Anwendung eines standardisierten SHT-Modells eine verringerte Knochendichte im Humerus sowohl kortikal als auch trabekulär nachweisen<sup>19</sup>. Darüber hinaus wurde neben einer reduzierten Knochenmineralisierung ebenfalls ein vermindertes Längenwachstum junger Mäuse nach SHT beschrieben<sup>20</sup>. Paradoxe Weise wurden ebenfalls zahlreiche Studien publiziert, die das Vorliegen einer verbesserten Frakturheilung nach SHT thematisieren. So ließ sich in Patient:innen, bei denen eine Fraktur eines langen Röhrenknochens mit kombiniertem SHT vorlag, radiologisch eine um bis zu zehn Wochen akzelerierte Frakturheilung sowie ein durchschnittlich höheres Kallusvolumen nachweisen<sup>21,22</sup>. Weitere klinische Studien beschreiben neben der Verbesserung der Frakturheilung auch ein gehäuftes Auftreten von heterotopen Ossifikationen nach SHT<sup>23,24</sup>. Auch in verschiedenen experimentellen Studien konnte im Rahmen einer Fraktur mit kombiniertem SHT eine verbesserte Knochenheilung nachgewiesen werden<sup>25-27</sup>. Obwohl diese Effekte in der durchgeführten Studie zumindest in frühen Phasen der Frakturheilung nicht nachweisen konnten, scheint die pharmakologische Erhöhung der endogenen Noradrenalin-Level jedoch zumindest bei einer längerfristigen Therapie vergleichbare Auswirkungen sowohl auf den intakten Knochen als auch auf die Frakturheilung zu bewirken.

Nach ausgedehntem Neuronenuntergang infolge eines SHTs, Schlaganfalls, einer Rückenmarksverletzung oder einer Enzephalitis kann es darüber hinaus zu einer paroxysmalen sympathischen Hyperaktivität (PSH) kommen. Dieses seltene, jedoch wichtige Krankheitsbild ist durch eine autonome Überaktivität mit fehlender negativer Rückkopplung gekennzeichnet und äußert sich unter anderem durch Tachykardie, arterielle Hypertonie und übermäßiges Schwitzen. Durch die schwierige differenzialdiagnostische Abgrenzung, der vergleichsweise niedrigen Inzidenz sowie einer meist infausten Prognose umfasst die klinische Datenlage bezüglich PSH und Knochenmetabolismus jedoch nur einzelne Case-Reports und ist, ebenso wie die experimentelle Datenlage, momentan als unzureichend anzusehen.



Ebenso geht chronischer Stress mit einer Erhöhung systemischer Noradrenalin-Level einher. Auch hier wurden bereits negative Effekte auf den Knochenmetabolismus beschrieben. So führte chronischer psychosozialer Stress, der im Mausmodell durch eine untergeordnete Gruppenhaltung simuliert wurde, zu einem verminderten Knochen-Längenwachstum sowie zum Verlust trabekulärer Knochenmasse und einer Abnahme der Knochendichte im Femur<sup>28</sup>. Darüber hinaus wurde unter Verwendung desselben Modells eine verzögerte Frakturheilung beobachtet, welche durch eine einmalige Verabreichung des Betarezeptorenblockers Propranolol aufgehoben werden konnte, und mit einer veränderten lokalen Immunantwort einherging: chronisch psychosozialer Stress führte in der Entzündungs- und Granulationsphase der Frakturheilung im Kallus zu einer Depletion von Interleukin-6 sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten<sup>29</sup>. Die unterschiedlichen Auswirkungen von stressbedingtem, endogenem und pharmakologisch augmentiertem noradrenergen Signaling auf die Frakturheilung lassen sich somit möglicherweise auf immunologische Prozesse in den frühen und intermediären Stadien des Heilungsprozesses zurückführen.

Eine weitere Entität von erhöhtem noradrenergem Signaling stellt das Phäochromozytom dar. Diese Art Tumor entsteht im Nebennierenmark oder dem sympathischen Grenzstrang und geht mit einer erhöhten Produktion von Katecholaminen, inklusive Noradrenalin, einher. Folglich leiden betroffene Patient:innen unter arterieller Hypertension, welche anfallsartig oder persistierend auftritt und sich durch übermäßiges Schwitzen, Kopfschmerzen oder Schwindel äußern kann. Mehrere unabhängige klinische Studien haben den Knochenmetabolismus in Patient:innen mit Phäochromozytom bereits untersucht und pathologische Veränderungen feststellen können. So wurde im Rahmen einer Case-Control Studie ein Knochenmasseverlust von 7.2% in der lumbalen Wirbelsäule beschrieben, während an Femurschaft und Hüfte der gleichen Probanden keine Veränderungen nachgewiesen wurden<sup>30</sup>. Darüber hinaus beschrieben auch Yakomoto-Umakoshi et al. einen Verlust trabekulärer Knochenmasse in der lumbalen Wirbelsäule von Patient:innen mit Phäochromozytom, welcher mit Größe und hormoneller Aktivität des Tumors korrelierte und nach operativer Resektion rückläufig war<sup>31</sup>. Sowohl die tumorbedingte als auch die pharmakologische Erhöhung von noradrenergem Signaling führt somit zu einem Verlust trabekulärer Knochenmasse in der Wirbelsäule, welcher gleichermaßen in klinischem sowie experimentellen Setting nachgewiesen werden konnte.

Neben der systemischen Erhöhung der Noradrenalin-Level durch die oben genannten Pathologien und pharmakologischen Therapien gibt es ebenfalls Hinweise dafür, dass eine Verminderung von Noradrenalin bzw. dessen Wirkung den Knochenmetabolismus beeinflussen kann. Betarezeptorenblocker senken den myokardialen Sauerstoffbedarf und werden unter anderem in der Therapie der koronaren Herzkrankheit, der Herzinsuffizienz sowie der arteriellen Hypertonie eingesetzt. In klinischen Beobachtungs- und Case-Control-Studien wurde die Behandlung mit Betarezeptorenblockern wie Propranolol mit einem reduzierten Frakturrisiko in Verbindung gebracht und wiederholt eine höhere Knochendichte in den Behandlungsgruppen beschrieben<sup>32-35</sup>. Definitive und kausale Rückschlüsse auf den Einfluss von Betarezeptorenblockern auf die Frakturheilung sind aufgrund der eingeschränkten Datenlage zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der bisher durchgeführten klinischen Studien allerdings weitere,

bedeutende Hinweise für das enge Zusammenspiel von noradrenergem Signaling und Knochenmetabolismus.

Trotz den umfassenden Forschungsprojekten zur Interaktion von noradrenergem Signaling und dem Knochenmetabolismus bleiben die zugrundeliegenden, mechanistischen Vorgänge der divergierenden Effekte auf den frakturierten Knochen sowie der lokal unterschiedlichen Auswirkungen auf den intakten Knochen jedoch weiter unklar. Darüber hinaus ergeben sich in der durchgeführten Studie weitere Limitationen durch die ausschließliche Verwendung weiblicher Tiere, sodass der Einfluss männlicher Geschlechtshormone auf die Frakturheilung und Unterschiede zwischen den Geschlechtern in dem gewählten experimentellen Setting nicht berücksichtigt werden können. Zudem lassen sich Unterschiede durch die intermittierende Verabreichung von Reboxetin mittels täglicher Injektionen nicht ausschließen, während in Referenzstudien zum Teil Pumpen für eine kontinuierliche Verabreichung des Pharmakons verwendet wurden. Eine weitere Variable ergibt sich durch die zentrale bzw. nicht gewebespezifische NET-Inhibierung durch Reboxetin<sup>36</sup>. Somit gilt es in weiteren Studien zu explorieren, über welche molekulare Mechanismen die SNRI-vermittelten Effekte auf den Knochenmetabolismus zustande kommen und inwiefern eine selektive Aktivierung bzw. Inhibierung dieser im klinischen Alltag möglicherweise vorteilhaft genutzt werden könnte.

Eine klare Indikation für einen off-label Einsatz von Reboxetin, um die Frakturheilung zu verbessern bzw. Pseudarthrosen zu verhindern, ergibt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht. Die erhöhte Kallusstabilität in der Konsolidierungsphase steht den unerwünschten Effekten auf den trabekulären Knochen der Wirbelsäule gegenüber und rechtfertigt den klinischen Einsatz zur Verbesserung der Frakturheilung nach jetzigem Erkenntnisstand und aktueller Datenlage nicht. Darüber hinaus bleibt trotz vergleichbarer Effekte eines erhöhten noradrenergen Signalings auf den Knochenmetabolismus in klinischen Studien unklar, inwieweit sich die Ergebnisse auf Patient:innen übertragen lassen, da sich insbesondere unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Ethnie und Vorerkrankungen eine komplexe Situation mit vielen, bislang weitestgehend unberücksichtigten Variablen ergibt.

Neben einer pharmakologischen Manipulation von noradrenergem Signaling bestehen jedoch selbstverständlich auch eine Reihe alternativer Ansatzpunkte zur Verbesserung der Frakturheilung bzw. der Prävention von Pseudarthrosen. So führt die intermittierende Behandlung mit dem Parathormon-Analogen Teriparatid, welches klinisch standardisiert zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose verwendet wird, im Mausmodell zu einer verbesserten Frakturheilung<sup>37,38</sup>. Darüber hinaus stellt die Verwendung von bioresorbierbaren Implantaten auf Magnesiumbasis insbesondere für die Prävention und Revisionsoperationen atropher Pseudarthrosen eine vielversprechende Behandlungsoption dar, da lokale osteoanabole Effekte zu einer verbesserten Kallusmineralisierung beitragen könnten. Diese und viele weitere neuartige Therapieansätze gilt es in den kommenden Jahren und Jahrzehnten in weiteren experimentellen und klinischen Studien eingehend zu untersuchen, bevor sie standardisiert im klinischen Alltag eingesetzt werden können, um die Behandlung von Patient:innen mit Frakturen und anderen Knochenerkrankungen nachhaltig zu verbessern.

## Zusammenfassung

Zusammenfassend ergibt sich aus den Ergebnissen der durchgeführten Studie kein Hinweis auf eine verzögerte oder ausbleibende Frakturheilung unter Behandlung mit dem SNRI Reboxetin. Die Behandlung mit SNRIs könnte für Patient:innen in der späten Phase der Frakturheilung sogar von Vorteil sein und die mechanische Stabilität des Kallus erhöhen. In Einklang mit den Daten vorheriger Studien führte die chronische Behandlung mit Reboxetin jedoch zum Verlust von trabekulärem Knochen in der Wirbelsäule. Zeitgleich ließ sich ein osteoanaboler Effekt auf den kortikalen Knochen des kontralateralen Femurs nachweisen, welcher so zuvor noch nicht beschrieben wurde. Inwiefern sich eine gewebspezifische NET-Inhibierung auf den Knochenmetabolismus auswirkt, welche Mechanismen für die lokal unterschiedlichen Effekte auf den intakten Knochen verantwortlich sind sowie mögliche klinische Applikationen zur Verbesserung der Frakturheilung bleiben abschließend in weiterführenden Studien zu untersuchen.

## Literaturverzeichnis

1. Hak, D.J., Fitzpatrick, D., Bishop, J.A., Marsh, J.L., Tilp, S., Schnettler, R., Simpson, H., and Alt, V. (2014). Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* 45 Suppl 2, S3-7. 10.1016/j.injury.2014.04.002.
2. Tzioupis, C., and Giannoudis, P.V. (2007). Prevalence of long-bone non-unions. *Injury* 38 Suppl 2, S3-9. 10.1016/s0020-1383(07)80003-9.
3. Wichlas, F., Tsitsilonis, S., Disch, A.C., Haas, N.P., Hartmann, C., Graef, F., and Schwabe, P. (2015). Long-term functional outcome and quality of life after successful surgical treatment of tibial nonunions. *Int Orthop* 39, 521-525. 10.1007/s00264-014-2629-y.
4. Zhu, Y., Ma, Y., and Elefteriou, F. (2018). Cortical bone is an extraneuronal site of norepinephrine uptake in adult mice. *Bone Rep* 9, 188-198. 10.1016/j.bonr.2018.11.002.
5. Aitken, S.J., Landao-Bassonga, E., Ralston, S.H., and Idris, A.I. (2009). Beta2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 482, 96-103. 10.1016/j.abb.2008.11.012.
6. Pierroz, D.D., Bonnet, N., Bianchi, E.N., Bouxsein, M.L., Baldock, P.A., Rizzoli, R., and Ferrari, S.L. (2012). Deletion of  $\beta$ -adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *J Bone Miner Res* 27, 1252-1262. 10.1002/jbmr.1594.
7. Ma, Y., Krueger, J.J., Redmon, S.N., Uppuganti, S., Nyman, J.S., Hahn, M.K., and Elefteriou, F. (2013). Extracellular norepinephrine clearance by the norepinephrine transporter is required for skeletal homeostasis. *J Biol Chem* 288, 30105-30113. 10.1074/jbc.M113.481309.
8. Agarwal, S., Germosen, C., Kil, N., Bucovsky, M., Colon, I., Williams, J., Shane, E., and Walker, M.D. (2020). Current anti-depressant use is associated with cortical bone deficits and reduced physical function in elderly women. *Bone* 140, 115552. 10.1016/j.bone.2020.115552.
9. Lanteigne, A., Sheu, Y.H., Stürmer, T., Pate, V., Azrael, D., Swanson, S.A., and Miller, M. (2015). Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor and selective serotonin reuptake inhibitor use and risk of fractures: a new-user cohort study among US adults aged 50 years and older. *CNS Drugs* 29, 245-252. 10.1007/s40263-015-0231-5.
10. Jiang, S., Knapstein, P., Donat, A., Tsitsilonis, S., and Keller, J. (2021). An optimized protocol for a standardized, femoral osteotomy model to study fracture healing in mice. *STAR Protoc* 2, 100798. 10.1016/j.xpro.2021.100798.
11. Ferroni, L., Gardin, C., Bellin, G., Vindigni, V., Pavan, C., and Zavan, B. (2019). Effects of novel antidepressant drugs on mesenchymal stem cell physiology. *Biomed Pharmacother* 114, 108853. 10.1016/j.biopha.2019.108853.
12. Bakken, M.S., Engeland, A., Engesæter, L.B., Ranhoff, A.H., Hunskaar, S., and Ruths, S. (2013). Increased risk of hip fracture among older people using antidepressant drugs: data from the Norwegian Prescription Database and the Norwegian Hip Fracture Registry. *Age Ageing* 42, 514-520. 10.1093/ageing/afp009.

13. Moura, C., Bernatsky, S., Abrahamowicz, M., Papaioannou, A., Bessette, L., Adachi, J., Goltzman, D., Prior, J., Kreiger, N., Towheed, T., et al. (2014). Antidepressant use and 10-year incident fracture risk: the population-based Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMoS). *Osteoporos Int* 25, 1473-1481. 10.1007/s00198-014-2649-x.
14. Wang, C.Y., Fu, S.H., Wang, C.L., Chen, P.J., Wu, F.L., and Hsiao, F.Y. (2016). Serotonergic antidepressant use and the risk of fracture: a population-based nested case-control study. *Osteoporos Int* 27, 57-63. 10.1007/s00198-015-3213-z.
15. Shea, M.L., Garfield, L.D., Teitelbaum, S., Civitelli, R., Mulsant, B.H., Reynolds, C.F., 3<sup>rd</sup>, Dixon, D., Doré, P., and Lenze, E.J. (2013). Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor therapy in late-life depression is associated with increased marker of bone resorption. *Osteoporos Int* 24, 1741-1749. 10.1007/s00198-012-2170-z.
16. Sobieraj, D.M., Martinez, B.K., Hernandez, A.V., Coleman, C.I., Ross, J.S., Berg, K.M., Steffens, D.C., and Baker, W.L. (2019). Adverse Effects of Pharmacologic Treatments of Major Depression in Older Adults. *J Am Geriatr Soc* 67, 1571-1581. 10.1111/jgs.15966.
17. Smith, É., Comiskey, C., and Carroll, Á. (2016). Prevalence of and risk factors for osteoporosis in adults with acquired brain injury. *Ir J Med Sci* 185, 473-481. 10.1007/s11845-016-1399-5.
18. Banham-Hall, N., Kothwal, K., Pipkin, J., Bentley, J., and Dickens, G.L. (2013). Prevalence of low bone mineral density in inpatients with traumatic brain injury receiving neurobehavioural rehabilitation: a postoperative, observational study. *Physiotherapy* 99, 328-334. 10.1016/j.physio.2012.12.009.
19. Brady, R.D., Shultz, S.R., Sun, M., Romano, T., van der Poel, C., Wright, D.K., Wark, J.D., O'Brien, T.J., Grills, B.L., and McDonald, S.J. (2016). Experimental Traumatic Brain Injury Induces Bone Loss in Rats. *J Neurotrauma* 33, 2154-2160. 10.1089/neu.2014.3836.
20. Yu, H., Watt, H., and Mohan, S. (2014). The negative impact of traumatic brain injury (TBI) on bone in a mouse model. *Brain Inj* 28, 244-251. 10.3109/02699052.2013.859735.
21. Giannoudis, P.V., Mushtaq, S., Harwood, P., Kambhampati, S., Dimoutsos, M., Stavrou, Z., and Pape, H.C. (2006). Accelerated bone healing and excessive callus formation in patients with femoral fracture and head injury. *Injury* 37 Suppl 3, S18-24. 10.1016/j.injury.2006.08.020.
22. Yang, T.Y., Wang, T.C., Tsai, Y.H., and Huang, K.C. (2012). The effects of an injury to the brain on bone healing and callus formation in young adults with fractures of the femoral shaft. *J Bone Joint Surg Br* 94, 227-230. 10.1302/0301-620x.94b2.28193.
23. Simonsen, L.L., Sonne-Holm, S., Krasheninnikoff, M., and Engberg, A.W. (2007). Symptomatic heterotopic ossification after very severe traumatic brain injury in 114 patients: incidence and risk factors. *Injury* 38, 1146-1150. 10.1016/j.injury.2007.03.019.
24. Genêt, F., Jourdan, C., Schnitzler, A., Lautridou, C., Guillemot, D., Judet, T., Poiraudreau, S., and Denormandie, P. (2011). Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PLoS One* 6, e16632. 10.1371/journal.pone.0016632.
25. Locher, R.J., Lünemann, T., Garbe, A., Schaser, K., Schmidt-Bleek, K., Duda, G., and Tsitsilonis, S. (2015). Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a

- combined murine trauma model. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 15, 309-315.
26. Song, Y., Han, G.X., Chen, L., Zhai, Y.Z., Dong, J., Chen, W., Li, T.S., and Zhu, H.Y. (2017). The role of the hippocampus and the function of calcitonin gene-related peptide in the mechanism of traumatic brain injury accelerating fracture-healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 1522-1531.
  27. Liu, W., Chen, W., Xie, M., Chen, C., Shao, Z., Zhang, Y., Zhao, H., Song, Q., Hu, H., Xing, X., et al. (2023). Traumatic brain injury stimulates sympathetic tone-mediated bone marrow myelopoiesis to favor fracture healing. *Signal Transduct Target Ther* 8, 260. 10.1038/s41392-023-01457-w.
  28. Foertsch, S., Haffner-Luntzer, M., Kroner, J., Gross, F., Kaiser, K., Erber, M., Reber, S.O., and Ignatius, A. (2017). Chronic psychosocial stress disturbs long-bone growth in adolescent mice. *Dis Model Mech* 10, 1399-1409. 10.1242/dmm.030916.
  29. Haffner-Luntzer, M., Foertsch, S., Fischer, V., Prystaz, K., Tschaffon, M., Mödinger, Y., Bahney, C.S., Marcucio, R.S., Miclau, T., Ignatius, A., and Reber, S.O. (2019). Chronic psychosocial stress compromises the immune response and endochondral ossification during bone fracture healing via  $\beta$ -AR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 8615-8622. 10.1073/pnas.1819218116.
  30. Kim, B.J., Kwak, M.K., Ahn, S.H., Kim, H., Lee, S.H., Song, K.H., Suh, S., Kim, J.H., and Koh, J.M. (2017). Lower Bone Mass and Higher Bone Resorption in Pheochromocytoma: Importance of Sympathetic Activity on Human Bone. *J Clin Endocrinol Metab* 102, 2711-2718. 10.1210/jc.2017-00169.
  31. Yokomoto-Umakoshi, M., Umakoshi, H., Sakamoto, R., Fukumoto, T., Ogata, M., Nakano, Y., Iwahashi, N., Kaneko, H., Mizoguchi, N., Hattori, A., et al. (2021). Role of deteriorated bone quality in the development of osteoporosis in pheochromocytoma and paraganglioma. *Bone* 142, 115607. 10.1016/j.bone.2020.115607.
  32. de Vries, F., Souverein, P.C., Cooper, C., Leufkens, H.G., and van Staa, T.P. (2007). Use of beta-blockers and the risk of hip/femur fracture in the United Kingdom and The Netherlands. *Calcif Tissue Int* 80, 69-75. 10.1007/s00223-006-0213-1.
  33. Pasco, J.A., Henry, M.J., Sanders, K.M., Kotowicz, M.A., Seeman, E., and Nicholson, G.C. (2004). Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 19, 19-24. 10.1359/jbmr.0301214.
  34. Bonnet, N., Gadois, C., McCloskey, E., Lemineur, G., Lespessailles, E., Courteix, D., and Benhamou, C.L. (2007). Protective effect of beta blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone* 40, 1209-1216. 10.1016/j.bone.2007.01.006.
  35. Lary, C.W., Hinton, A.C., Nevola, K.T., Shireman, T.I., Motyl, K.J., Houseknecht, K.L., Lucas, F.L., Hallen, S., Zullo, A.R., Berry, S.D., and Kiel, D.P. (2020). Association of Beta Blocker Use With Bone Mineral Density in the Framingham Osteoporosis Study: A Cross-Sectional Study. *JBMR Plus* 4, e10388. 10.1002/jbm4.10388.
  36. Wong, E.H., Sonders, M.S., Amara, S.G., Tinholt, P.M., Piercey, M.F., Hoffmann, W.P., Hyslop, D.K., Franklin, S., Porsolt, R.D., Bonsignori, A., et al. (2000). Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. *Biol Psychiatry* 47, 818-829. 10.1016/s0006-3223(99)00291-7.

37. Zhang, L., Wang, T., Chang, M., Kaiser, C., Kim, J.D., Wu, T., Cao, X., Zhang, X., and Schwarz, E.M. (2017). Teriparatide Treatment Improves Bone Defect Healing Via Anabolic Effects on New Bone Formation and Non-Anabolic Effects on Inhibition of Mast Cells in a Murine Cranial Window Model. *J Bone Miner Res* 32, 1870-1883. 10.1002/jbmr.3178.
38. Mognetti, B., Marino, S., Barberis, A., Martin, A.S., Bala, Y., Di Carlo, F., Boivin, G., and Barbos, M.P. (2011). Experimental stimulation of bone healing with teriparatide: histomorphometric and microhardness analysis in a mouse model of closed fracture. *Calcif Tissue Int* 89, 163-171. 10.1007/s00223-011-9503-3.

## Kurzfassung

Die gestörte Frakturheilung stellt nach wie vor ein großes, klinisch relevantes Problem dar. Nachdem vorherige Studien bereits eine verminderte Knochenqualität und ein erhöhtes Frakturrisiko unter Behandlung mit Psychopharmaka beschrieben haben, stellte sich die klinisch relevante Frage, ob die Behandlung mit selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern (SNRIs) ebenfalls einen Risikofaktor für eine gestörte Knochenregeneration darstellt. Hierzu wurde die Frakturheilung unter Behandlung mit dem SNRI Reboxetin im standardisierten Mausmodell unter Verwendung eines Fixateur Externe untersucht. Der frakturierte Femur und das intakte Skelett wurden mittels histomorphometrischer, biomechanischer und molekulargenetischer Verfahren zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Verschlechterung der Frakturheilung unter Reboxetin-Behandlung festgestellt werden. Am Tag 28 zeigte sich zudem eine verbesserte knöcherne Überbrückung des Frakturspalts in der Behandlungsgruppe, welche mit einer erhöhten Kallusstabilität einherging. Darüber hinaus führte die chronische Reboxetin-Behandlung zu einem Knochenmasseverlust des trabekulären Knochens in der Wirbelsäule. Im kontralateralen Femur ließen sich keine Unterschiede im trabekulären Knochen, jedoch eine verdickte Kortikalis nachweisen. Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse somit auf eine normale Frakturheilung und lokal unterschiedliche Effekte von Reboxetin auf den gesunden Knochen schließen. Patient:innen, die mit SNRIs behandelt werden, könnten in späten Stadien der Frakturheilung von der Behandlung profitieren.

Impaired fracture healing remains a challenging obstacle for patients and treating physicians. As previous studies showed reduced bone quality and higher risk of fracture upon treatment with psychotropic drugs such as selective noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs), the clinically relevant question whether treatment might also impair bone regeneration arose. Therefore, the effects of the SNRI reboxetine on the fracture healing process were analyzed in a standardized murine fracture model. Histomorphometrical, biomechanical and molecular genetical assessment of the fractured femur and intact bones was carried out at different timepoints. Surprisingly, the fracture healing process was not impaired upon treatment with reboxetine. On day 28 after fracture improved bone bridging and higher mechanical stability of the callus was observed in the treatment group. In addition, chronic treatment with reboxetine caused a loss of trabecular bone in the spine. The trabecular bone of the contralateral femur was not affected by treatment, while cortical bone mass was increased. In sum, the results did not provide evidence for impaired fracture healing under treatment with reboxetine and pointed towards site-specific effects on the intact bone. Patients using SNRIs may benefit from treatment during late stages of the fracture healing process.



## **Erklärung des Eigenanteils an der Publikation**

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. Johannes Keller durchgeführt.

Die Konzeption und Planung der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit den Projektleitern Prof. Dr. Dr. Johannes Keller und Dr. Anke Baranowsky. Eine ausführliche Literaturrecherche im Vorfeld des Versuchsvorhabens sowie das Verfassen des Tierversuchsantrags wurden eigenständig von mir durchgeführt.

Sämtliche Versuche, inklusive der chirurgischen Eingriffe, der Probenaufarbeitung und der Auswertung der Ergebnisse, wurden eigenständig von mir durchgeführt. Die Anfertigung der mikroskopischen Präparate sowie deren Färbung erfolgte mit Unterstützung durch die technischen Assistentinnen Cordula Erdmann und Saskia Schröder. Die biomechanische Analyse wurde von PD Dr. Timur Yorgan durchgeführt. Die Ko-Autoren Shan Jiang, Weixin Xie, Paul Richard Knapstein, Lilly-Charlotte Albertsen, Judith Luisa Kokot, Jan Sevecke und Ruben Augustin assistierten im Rahmen der chirurgischen Eingriffe bei Narkoseeinleitung und postoperativen Kontrollen sowie bei dem Töten der Versuchstiere.

Die Auswertung morphologischer Parameter mittels  $\mu$ CT, die Analyse zellulärer Parameter mittels Osteomeasure und die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR nach RNA-Isolation und mRNA-Transkription erfolgte durch mich. Die Sichtung sowie statistische Auswertung und Interpretation aller Ergebnisse erfolgte eigenständig in enger Abstimmung mit den Projektleitern.

Ich versichere, die Dissertationsschrift ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben und keine weiteren als die von mir genannten Quellen verwendet zu haben.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen und Institutionen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Keller, welcher mich für wissenschaftliches Arbeiten nachhaltig begeistern konnte und zu jeder Tages- und Nachtzeit bei Problemen erreichbar war. Neben der hervorragenden wissenschaftlichen Betreuung empfand ich auch den persönlichen Austausch als äußerst wertvoll und inspirierend. Auch dem Klinikdirektor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie, Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Frosch, möchte ich besonderen Dank aussprechen.

Ebenso möchte ich Frau Dr. Anke Baranowsky für ihre unermüdliche Unterstützung und Anleitung im Labor in allen Phasen des Projekts danken. Ihre Expertise hat wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus gilt mein außerordentlicher Dank dem gesamten Team der AG Keller sowie den Kollegen und Kolleginnen der Forschungstierhaltung, die mich mit ihrer fachlichen Expertise und langjährigen Erfahrung in verschiedensten Bereichen des Projekts unterstützt haben. Ferner möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Ergebnisse der Studie auf nationalen und internationalen Fachkongressen vorstellen zu dürfen. Auch der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) möchte ich für die finanzielle Unterstützung und den Erhalt des Doktoranden-Stipendiums danken.

Nicht zuletzt gilt mein größter Dank meinen Eltern Lutz Donat und Marion Hahn-Donat, welche mich früh zu eigenständigem Denken angeleitet und mich auf meinem bisherigen Lebensweg stets vollends unterstützt haben. Ihnen widme ich diese Arbeit.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Antonia Simone Donat  
Geburtsdatum/-ort 03.07.1998 in Berlin  
Familienstand ledig

### Schullaufbahn

2004-2009 Johann-Peter-Hebel Grundschule, Berlin  
2009-2010 Hildegard-Wegscheider-Gymnasium, Berlin  
2010-2016 Sportschule Frankfurt (Oder)  
Abschluss: Abitur

### Studium

Seit 10/2016 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg  
2019: Äquivalenz zum 1. Staatsexamen  
2022: 2. Staatsexamen  
01-03/2020 Auslandsaufenthalt an der Universidad Autónoma de Madrid, Spanien

### Praktisches Jahr

Innere Medizin: Hospital Clínico der Pontífica Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile  
Chirurgie: LMU Klinikum Großhadern, München  
Gynäkologie: The Royal London Hospital, London, UK  
New Somerset Hospital, Kapstadt, Südafrika

### Dissertation

Experimentelle Arbeit bei Prof. Dr. Dr. J. Keller zum Thema „The selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine promotes late-stage fracture healing in mice“, in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

## Publikationsliste

Donat, A., Jiang, S., Xie, W., Knapstein, P.R., Albertsen, L.C., Kokot, J.L., Sevecke, J., Augustin, R., Jahn, D., Yorgan, T.A., et al. (2023). The selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine promotes late-stage fracture healing in mice. *iScience* 26, 107761. 10.1016/j.isci.2023.107761.

**Eigenanteil:** siehe oben

Jahn, D., Knapstein, P.R., Otto, E., Köhli, P., Sevecke, J., Graef, F., Graffmann, C., Fuchs, M., Jiang, S., Rickert, M., et al. (2023). Increased beta2-adrenergic signaling is a targetable stimulus essential for bone healing by promoting callus neovascularization. *bioRxiv*. 10.1101/2023.07.14.548550.

**Eigenanteil:** Assistenz bei chirurgischen Eingriffen, Töten der Versuchstiere, Probenaufarbeitung und Datenerhebung

Knapstein, P.R., Donat, A., Keller, J. (2023). Procalcitonin As a Biomarker and Mediator of Sepsis: Implications for Critical Care. In: *Biomarkers in Trauma, Injury and Critical Care*. Rajendram, R., Preedy, V.R., Patel, V.B. (Hrg.) Springer International Publishing, Cham, 613-637. 10.1007/978-3-031-07395-3\_31.

**Eigenanteil:** Literaturrecherche, Erstellen der Tabellen und Abbildungen, Verfassen des Manuskripts

Messerer, D.A.C., Datzmann, T., Baranowsky, A., Peschel, L., Hoffmann, A., Gröger, M., Amling, M., Wepler, M., Nussbaum, B.L., Jiang, S., et al. (2022). Systemic calcitonin gene-related peptide receptor antagonism decreases survival in a porcine model of polymicrobial sepsis: blinded randomised controlled trial. *Br J Anaesth* 128, 864-873. 10.1016/j.bja.2021.11.042.

**Eigenanteil:** Probenaufarbeitung und Datenerhebung

Baranowsky, A., Jahn, D., Jiang, S., Yorgan, T., Ludewig, P., Appelt, J., Albrecht, K.K., Otto, E., Knapstein, P., Donat, A., et al. (2022). Procalcitonin is expressed in osteoblasts and limits bone resorption through inhibition of macrophage migration during intermittent PTH treatment. *Bone Res* 10, 9. 10.1038/s41413-021-00172-y.

**Eigenanteil:** Injektionen, Töten der Versuchstiere, Probenaufarbeitung und Datenerhebung, *in vitro* Experimente

Grewe, J.M., Knapstein, P.R., Donat, A., Jiang, S., Smit, D.J., Xie, W., and Keller, J. (2022). The role of sphingosine-1-phosphate in bone remodeling and osteoporosis. *Bone Res* 10, 34. 10.1038/s41413-022-00205-0.

**Eigenanteil:** Literaturrecherche, Durchsicht und Überarbeitung des Manuskripts

Jiang, S., Knapstein, P., Donat, A., Tsitsilonis, S., and Keller, J. (2021). An optimized protocol for a standardized, femoral osteotomy model to study fracture healing in mice. *STAR Protoc* 2, 100798. 10.1016/j.xpro.2021.100798.

**Eigenanteil:** Durchsicht und Überarbeitung des Manuskripts

Donat, A., Knapstein, P.R., Jiang, S., Baranowsky, A., Ballhause, T.M., Frosch, K.H., and Keller, J. (2021). Glucose Metabolism in Osteoblasts in Healthy and Pathophysiological Conditions. *Int J Mol Sci* 22. 10.3390/ijms22084120.


**Eigenanteil:** Literaturrecherche und Konzeption, Erstellen der Tabellen und Abbildungen, Verfassen des Manuskripts

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:  .....