



Deneysel fare femur kaynamama modelinde lokal uygulanan simvastatinin etkileri

Atilla KOÇER¹, Mithat ÖNER², İbrahim KARAMAN², Derya KOÇER³,
İbrahim Halil KAFADAR², Ahmet GÜNEY², Zehra Filiz KARAMAN⁴

¹Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Kayseri;

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Kayseri;

³Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Biyokimya Kliniği, Kayseri;

⁴Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyoloji Kliniği, Kayseri

Amaç: Bu çalışmanın amacı deneysel fare femur kaynamama modelinde lokal uygulanan simvastatinin etkilerini değerlendirmektir.

Çalışma planı: Bu çalışmada 32 Wistar albino fare kullanıldı. Fareler rastgele biçimde aşağıdaki 4 gruptan birine ayrıldı: iki kontrol grubu (kontrol-4 hafta [K4h] ve kontrol-8 hafta [K8h]) ve iki tedavi grubu (simvastatin-4 hafta [S4h] ve simvastatin-8 hafta [S8h]). Kontrol gruplarında cerrahi girişimden sonra 1 hafta süreyle dimetilsülfoksit (10 mg/kg/gün) lokal olarak enjekte edildi. Tedavi gruplarında ameliyat sonrası birinci günden itibaren 1 hafta boyunca simvastatinin sıvılaştırılmış formu (10 mg/kg/gün) lokal olarak osteotomi alanına enjekte edildi. K4h ve S4h gruplarındaki hayvanlar lokal tedavinin sonlanmasından 4 hafta, K8h ve S8h gruplarındaki hayvanlar ise 8 hafta sonra öldürüldü. Öldürülmeden önce biyokimyasal analiz için intrakardiyak kan örnekleri alındı ve radyografiler çekildi. Histopatolojik inceleme için farelerin sağ femurları çıkarıldı.

Bulgular: Radyolojik olarak incelendiğinde kontrol ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar mevcuttu. Tedavi gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek kemiğe spesifik alkalın fosfataz ve osteokalsin değerleri saptandı.

Çıkarımlar: Biyokimyasal, radyolojik ve histopatolojik sonuçlara göre, fare femur kaynamama modelinde simvastatinin lokal uygulanması yararlı etkiler oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Fare; femur; kaynamama; simvastatin.

Kemiğin rejenerasyon ve onarım kapasitesi ve tedavilerinde kaydedilen gelişmelere karşın kırıkların yaklaşık %5 ila 10'unda iyileşme süreci sorunludur.^[1] Kaynamama hem hasta hem de klinisyen için zorlu bir komplikasyon olup, sıklıkla uzun süreli tedavi gerektirir. Kaynamamanın etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, hem sistemik hem de lokal faktörlerin süreci etkilediği düşünülmektedir.^[2]

Hidroksimetilglutaril-koenzim A'yı (HMG-CoA) inhibe eden statinler kolesterol düşürücü ajanlar olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.^[3] Statinler, ayrıca, antioksidan,^[4] anti-enflamatuar^[5] ve vazodilatör^[6] etkilere sahiptir. Statinlerin hem doku kültürlerinde hem de sıçan ve farelerde osteoblast aktivitesini indüklediği ve kemik oluşumuna yol açtığı da rapor edilmiştir. Bunun akabinde de, statinlerin kemik üzerindeki metabolik et-

Yazışma adresi: Dr. İbrahim Karaman, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gevher Nesibe Hastanesi, 38030 Melikgazi, Kayseri.

Tel: +90 352 – 437 17 43 e-posta: drikaraman@gmail.com

Başvuru tarihi: 24.03.2014 **Kabul tarihi:** 06.07.2014

©2014 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu

www.aott.org.tr adresinde

doi: 10.3944/AOTT.2014.14.0120

Karekod (Quick Response Code)



kilerine ilişkin in vivo kanıtlar birikmeye başlamıştır.^[7,8]

Osteoblastik sentezden köken alan osteokalsin kemikte depolanır veya dolaşıma salgılanırken, kanda kemik oluşumunun histolojik ölçütleri ile de korelasyon gösterir.^[9,10] Kemiğe spesifik alkalın fosfataz (KAF), osteoblast membranında yerleşmiştir ve kemik oluşumuna dair en sık başvurulan belirteçtir.^[11]

Bu çalışmada, serum kemik belirteçleri olan KAF ve osteokalsinin serum seviyelerindeki değişimini ölçerek ve radyolojik ve histopatolojik değişiklikleri değerlendirerek deneysel fare femur kaynamama modelinde lokal olarak uygulanan simvastatinin etkilerini araştırdık.

Gereç ve yöntem

Bu çalışmada ortalama 8 (dağılım: 7-9) haftalık ve 250 (dağılım: 236-275) gram ağırlığa sahip 32 erkek Wistar albino fare kullanıldı ve rastgele biçimde aşağıdaki 4 gruptan birine ayrıldı: iki kontrol grubu (kontrol-4 hafta [K4h] ve kontrol-8 hafta [K8h]) ve iki tedavi grubu (simvastatin-4 hafta [S4h] ve simvastatin-8 hafta [S8h]). Fareler 10/14 saat ışık-karanlık döngüsüne maruz bırakıldı, normal oda sıcaklığında tutuldu ve standart fare yemi ve musluk suyu ile beslendi. Çalışma protokolü Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi tarafından 8 Nisan 2009 tarihinde 09/27 sayılı yazı ile onaylandı.

Simvastatin çözeltisi Serin-Kilicoglu ve Erdemli'nin^[3] tanımladığı şekilde hazırlandı. Simvastatin (Zocor® 20 mg film tablet; Merck Sharp&Dohme, White House Station, NJ, ABD) hiçbir biyolojik etkinliğe sahip olmayan 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO; 100 ml %99.5, D-4540; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, ABD) içinde homojen bir şekilde seyreltilti. Simvastatin, tedavi gruplarında kaynamayan alana lokal olarak 10 mg/kg/gün şeklinde uygulandı.

Kaynamama modeli Garcia ve ark.'nın^[12] tanımladığı şekilde oluşturuldu. Tüm farelerin sağ femurları genel anestezi altında kırıldı ve 1.5 mm'lik Kirschner teli kullanılarak geriye doğru sabitlendi. Sabitlenme sonrasında, elektronik kumpasla kontrol edilerek tüm farelerde 1.8 mm bir boşluk oluşturuldu. Periostun soyulmasından sonra, farelerin femurları bir zımba teli kullanılarak

sabitlendi. Onuncu haftanın sonunda femurun kaynamadığı radyolojik olarak doğrulandı.

Kontrol gruplarında cerrahi girişimden sonra DMSO (10 mg/kg/gün) 1 hafta süreyle lokal olarak enjekte edildi. Tedavi gruplarında ameliyat sonrası birinci günden itibaren 1 hafta boyunca simvastatinin sıvılaştırılmış formu (10 mg/kg/gün) lokal olarak osteotomi alanına enjekte edildi. K4h ve S4h gruplarındaki hayvanlar lokal tedavinin sonlanmasından 4 hafta, K8h ve S8h gruplarındaki hayvanlar ise lokal tedavisinin sonlanmasından 8 hafta sonra öldürüldü. Öldürülmeden önce femurun anteroposterior ve lateral filmleri çekildi ve analizler için 3 ml kan alındı. Ölümden sonra hayvanların sağ femurları bir bütün olarak çıkarıldı ve her bir grubun histopatolojik incelemesine dek %10 formaldehit çözeltisine yerleştirildi.

Kaynamamış kırıkların değerlendirilmesinde Goldberg skorlama sistemi^[13] kullanıldı. Her bir femur radyografisi iki bağımsız ortopedi uzmanı ve bir radyoloji uzmanı tarafından incelendi. Bu üç skorun ortalaması analizler için kullanıldı.

Kırık iyileşmesinin histolojik değerlendirmesi için Huo ve ark.^[14] tarafından geliştirilen 10 puanlı ölçek kullanıldı.

Farelerden biyokimyasal testler için intrakardiyak kan örnekleri alındı. Plazmanın ayrılmasından sonra örnekler -70°C'de analizlere kadar saklandı. Serum total kolesterol seviyesi oto-analizör (Olympus AU2700; Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg, Almanya) kullanılarak analiz edildi. Serum KAF (IDS, Katalog No: AC-20F1) ve osteokalsin (IDS, Katalog NO: AC-12F1) ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü.

Veriler SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenen sürekli değişkenler normal dağılıma sahipti. Çalışma gruplarından elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri ile karşılaştırıldı. Korelasyon analizlerinde Spearman testinden yararlanıldı. Kalitatif değişkenlerde sonuçlar 'frekans ve persentil' olarak gösterildi. Kalitatif değişkenlerin karşı-

Tablo 1. Tedavi ve kontrol gruplarının Goldberg skorları.

Gruplar	0 puan		1 puan		2 puan		Toplam		x ²	p
	n	%	n	%	n	%	n	%		
K4h	7	87.5	0	0.0	1	12.5	8	100	15.051	0.020
K8h	5	62.5	1	12.5	2	25	8	100		
S4h	3	37.5	2	25	3	37.5	8	100		
S8h	1	12.5	0	0.0	7	87.5	8	100		
Toplam	16	50.0	3	37.5	13	40.6	32	100		

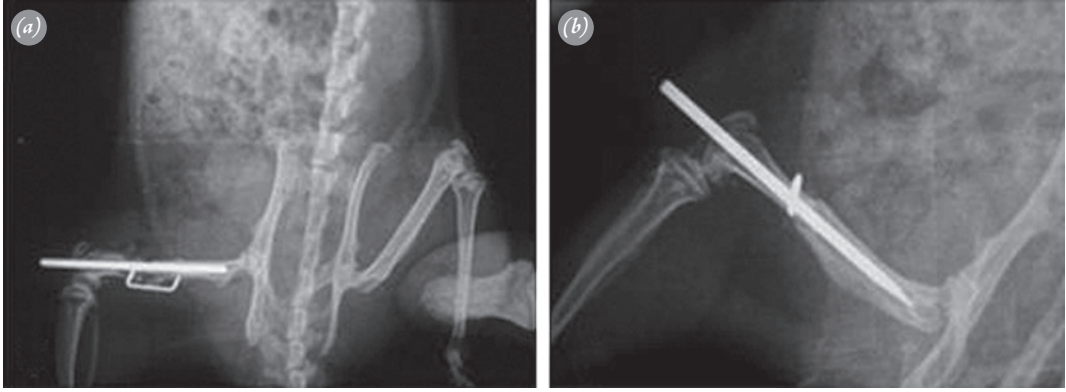
laştırması için ki-kare testi kullanıldı. $P < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Tüm sonuçlar standart sapma ile birlikte ortalama olarak gösterildi.

Bulgular

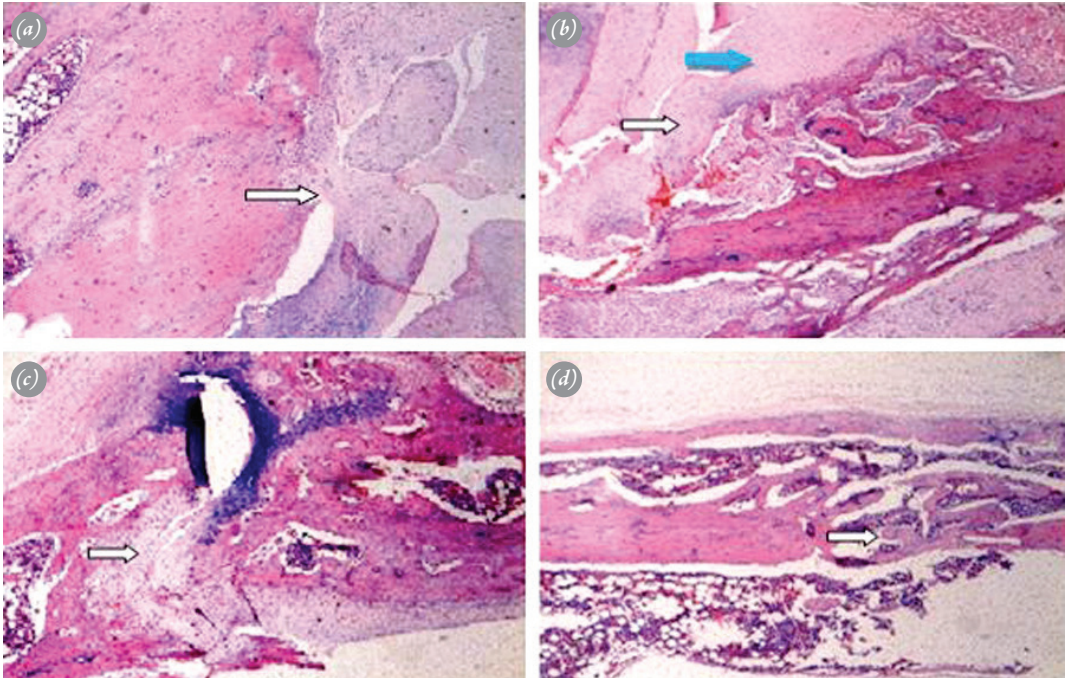
Kontrol ve tedavi gruplarının Goldberg skorları anlamlı şekilde farklıydı ($p < 0.05$). Tablo 1 tüm grupların Goldberg skorlarını göstermektedir. K4h, K8h, S4h ve S8h gruplarında Goldberg skorları sırasıyla 2, 5, 8 ve

14 idi. K4h grubunda 7 farede (%87.5) kaynamama, bir farede kaynama saptandı (%12.5). K8h grubunda 5 farede (%62.5) kaynamama, 1 farede (%12.5) olası kaynama kanıtı ve 2 farede (%25.0) kaynama gözlemlendi. S4h grubunda, 3 kaynamama (%37.5), iki olası kaynama (%25.0) ve 3 kaynama (%37.5), S8h grubunda 1 kaynamama (%12.5) ve 7 kaynama (%87.5) izlendi.

Kaynamama en sık K4h grubunda, kaynama ise en sık S8h grubunda gözlemlendi. Bunun ötesinde, S4h ve



Sekil 1. (a) Ameliyattan 10 hafta sonra 1.8 mm boşluk ve soyulmuş periostu ile birlikte K4h grubundan bir sağ femurun radyografisi. Grafide kaynamamanın tipik özellikleri görülebilir; kırık köprüleşmesinin olmaması, kallus oluşumunun yokluğu ve yuvarlak kemik uçları. (b) Kaynamamanın tipik özellikleri ile birlikte S8h grubundan bir sağ femurun radyografisi.



Sekil 2. Çalışma ve kontrol gruplarında lokal tedavinin sonundaki kırık kallusunun hematoxylin-eozin boyalı kesitlerinin mikroyapıları (büyütme: x40). (a) K4h grubunda fibröz dokunun (beyaz ok) görünümü. (b) K8h grubunda az miktarda kırık dokusu (beyaz ok) ve fibröz dokunun (mavi ok) görünümü. (c) S4h grubunda olgunlaşmamış kemik dokusunun (beyaz ok) görünümü. (d) S8h grubunda olgun kemik dokusu ile birlikte iyileşmenin (beyaz ok) görünümü. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

Tablo 2. Biyokimyasal ölçüm sonuçları.

Parametreler	K4h (n=8)	K8h (n=8)	S4h (n=8)	S8h (n=8)	F	p
	Ortalama±SS	Ortalama±SS	Ortalama±SS	Ortalama±SS		
Total kolesterol	112.3±10.8	112.7±16.1	94.5±9.9	92.2±11.8	6.440	0.002
Kemiğe spesifik alkalın fosfataz	12.2±0.8	12.4±2.2	19.7±1.6	22.6±1.1	85.478	<0.001
Osteokalsin	38.6±7.9	41.7±10.3	70.2±8.2	69.0±11.2	25.379	<0.001

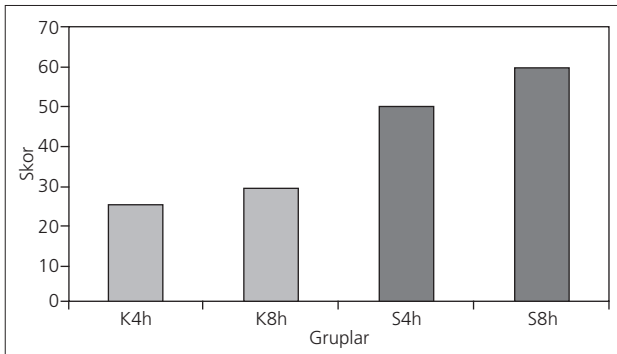
S8h grupları karşılaştırıldığında tedavi süresi uzadıkça femurda kaynama oranının arttığını belirledik (Şekil 1).

Kontrol ve tedavi gruplarında histopatolojik skorlar anlamlı şekilde farklıydı ($p<0.05$) (Şekil 2). K4h, K8h, S4h ve S8h gruplarının histopatolojik skorları sırasıyla 31, 35, 55 ve 66 idi. Tedavi ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, S4h ve S8h grupları arasında ve K4h ve S8h grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p<0.05$). Şekil 3 tüm grupların histopatolojik skorlarını göstermektedir. Aynı zamanda, S4h ve S8h gruplarında radyolojik ve histopatolojik skorlar arasında anlamlı pozitif korelasyonlar saptandı (sırasıyla, $r=0.878$, $p<0.05$ ve $r=0.756$, $p<0.05$).

Tablo 2'de gösterildiği üzere total kolesterol (TK), KAF ve osteokalsin seviyeleri açısından tedavi ve kontrol grupları arasında anlamlı farklar vardı ($p<0.05$). Kontrol gruplarına kıyasla TK seviyeleri tedavi gruplarında anlamlı şekilde daha düşüktü ($p<0.05$). K4h ve K8h grupları ($p=0.876$) veya S4h ve S8h grupları ($p=0.903$) arasında TK seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Kontrol gruplarına kıyasla plazma KAF düzeyleri tedavi gruplarında anlamlı şekilde daha yüksekti ($p<0.05$). KAF düzeyleri açısından K4h ve K8h grupları arasında anlamlı fark yokken ($p=0.898$), S8h grubundaki KAF düzeyleri S4h grubundaki düzeylerden anlamlı şekilde daha yüksekti ($p<0.05$).

Kontrol gruplarına kıyasla plazma osteokalsin düzeylerinin tedavi gruplarında anlamlı şekilde daha yük-

**Şekil 3.** Histopatolojik değerlendirme sonuçları.

sek olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo 2). K4h ve K8h grupları ($p=0.917$) veya S4h ve S8h grupları ($p=0.895$) arasında osteokalsin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tartışma

Bu deneysel çalışma radyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik bulgular ile ortaya konduğu üzere, deneysel koşullarda kırık iyileşmesinde simvastatinin olumlu etkilerini göstermiştir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar statinlerin kemik iyileşmesindeki olumlu etkilerine işaret eder. Bir deneysel çalışmada, kobaylara subkutanöz yoldan kırık bölgesine enjekte edilen simvastatin kırıktan 2 hafta sonra kallus alanını artırarak kırığı güçlendirmiştir.^[15] Bir başka çalışmada, simvastatin faredeki kırık bölgesine direkt olarak uygulanmış ve simvastatinin kırık iyileşmesinin biyomekanik parametreleri üzerinde çok önemli olumlu etkileri saptanmıştır.^[16] Fukui ve ark., düşük doz simvastatin ile konjuge edilen jelatin hidrojelini lokal olarak uygulanmasının klinik koşullarda kırık onarımı için umut vaat eden bir tedavi stratejisi olabileceğini belirtmişlerdir.^[17] Çalışmamızda, lokal uygulama için 10 mg/kg/gün dozu seçilmiştir. *In vivo* çalışmamız simvastatin uygulanmasının radyografik kırık onarımını teşvik ettiğini gösterirken, histopatolojik ve biyokimyasal skorlar üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu da ortaya koymuştur.

Ayukawa ve ark., lokal simvastatin uygulamasının kemik morfogenetik protein-2 (KMP-2) mRNA'nın uyarılması yoluyla kobaylarda osteoklastları baskılayarak ve osteoblastları artırarak kemik onarımını teşvik ettiğini bildirmişlerdir.^[18] Wang ve ark.'nın çalışmasında, yaşlı hastalar tarafından kullanılan statinin kalça kırığı riskini azalttığı ifade edilmektedir.^[19] Bir başka çalışmada, Edwards ve ark., menopoz sonrası kadınlarda statin alımıyla birlikte kemik mineral yoğunluğunda anlamlı artış olduğunu göstermişlerdir.^[20]

Çoğu gözlemsel çalışma statinlerin kemik kütlesi ve kırık riski üzerine olumlu etkilerini gösterirken,^[21,22] bazı tartışmalı veriler de mevcuttur.^[23] Van Staa ve ark., klinik pratikte reçete edilen dozlarda kullanılan sta-

tinlerin kırık riskinde azalma ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir.^[24] LaCroix ve ark. ise statin kullanımının menopoz sonrası kadınlarda kırık riskinde azalma veya kemik yoğunluğunda artışa yol açmadığını ve kümülatif kanıtların osteoporozu önlemek veya tedavi etmek için statin kullanımını önermediğini belirtmişlerdir.^[25] Bir başka çalışmada, von Stechow ve ark. statinlerin kemik oluşumu üzerinde aşikar in vivo etkilere sahip olmadığını rapor etmişlerdir.^[26]

Statinler yüksek dozlarda veya uzun süreli infüzyonlarda kemik oluşumunu uyarır. Bu durum, büyük oranda, ilacın oral uygulamasında karaciğerdeki ilk geçiş etkisine bağlıdır. Çok yüksek dozlar karaciğer ve kaslar için toksik olabilir.^[27] Garrett ve ark.'nın çalışmasında, statinlerin sadece lokal uygulandıklarında KMP-2 gen uyarıcı etkileri olduğu ortaya konmuştur.^[27] Gutierrez ve ark. oral ve lokal kullanımda lovastatinin kobaylarda kemik oluşumunu üzerine etkilerini karşılaştırmış ve statinlerin lokal uygulanmasının oral uygulamaya kıyasla kemik oluşumu üzerinde daha fazla yararlı etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.^[7] Bu nedenle, çalışmamızda simvastatin kırık alanına yakın bölgedeki dokulara lokal olarak uygulandı.

Pratik ve değerlendirmesi basit olan direkt radyografi, kırık iyileşmesinde kullanılan invaziv olmayan bir yöntemdir. Çalışmamızda, Goldberg ve ark.^[13] tarafından 1985 yılında geliştirilen ve birçok uzman tarafından benimsenen radyolojik sınıflama sistemi kullanıldı. Radyolojik bulgular incelendiğinde, tedavi ve kontrol grupları arasında Goldberg skorları açısından anlamlı bir fark belirledik. Aynı şekilde, S4h ve S8h grupları arasında da Goldberg skorları açısından anlamlı bir fark mevcuttu. Bu fark, biyokimyasal ve histopatolojik inceleme bulguları ile doğrulandı. Bu çalışmada, kırık iyileşmesinin histolojik incelemesi için Huo ve ark.^[14] tarafından geliştirilen bir ölçek kullanıldı. Kontrol grubunda daha fazla fibröz doku ve daha az miktarda kırık dokusu gözlenirken, simvastatin grubunda olgunlaşmamış ve olgunlaşmış kemik dokusu gözlemlendi. Tedavi ve kontrol gruplarının bulguları birlikte değerlendirildiğinde, S4h ve S8h gruplarında radyolojik ve histopatolojik skorlar arasında anlamlı ve güçlü pozitif korelasyonlar saptandı.

Lokal uygulanan simvastatinin sistemik etkileri ve kemik oluşumunu uyarıcı etkisini kanıtlamak için çeşitli biyokimyasal parametreler ölçülmüştür. Wang ve ark., tibia kırığı bulunan kobaylara lokal olarak uygulanan simvastatinin serum TK düzeylerini düşürdüğünü ve KAF düzeylerini arttırdığını göstermişlerdir.^[14] Gutierrez ve ark., transdermal lovastatin kullanımı ile kobaylarda osteokalsin seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir.^[7] Bu çalışmanın aksine, Rosenson ve ark., statinlerin

kemik oluşum belirteçleri osteokalsin ve KAF üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir.^[28]

Çalışmamızda, simvastatinin sistemik etkinliği serum TK düzeyleri ölçülerek gösterilmiş ve TK düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla tedavi grubunda daha düşük olduğu saptanmıştır. Kontrol gruplarına kıyasla plazma KAF ve osteokalsin düzeyleri tedavi gruplarında anlamlı şekilde daha yüksekti.

Sonuç olarak, radyolojik, histopatolojik ve biyokimyasal bulgular bir arada incelendiğinde, simvastatinin kaynamamış kırıkların iyileşmesine olumlu etki yaptığı söylenebilir. Güncel deneysel kanıtlar simvastatinin kırık iyileşmesi üzerinde potansiyel yararlı etkilerini ortaya koymaktadır. Ayrıca, simvastatinin güvenilir bir madde olduğu deneysel çalışmalarca da kanıtlanmıştır. Simvastatinin gelecekte kırık iyileşmesinde lokal kullanım açısından potansiyel taşıdığına inanıyoruz. Bu yüzden, bu maddenin klinik koşullardaki etkisinin incelendiği gelecek çalışmalara gereksinim vardır.

Çıkar örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

1. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res 1998;(355 Suppl):7-21.
2. LaVelle DG. Delayed union and nonunion of fractures. In: Canale ST, editor. Campbell's Operative Orthopaedics. 10th ed. Philadelphia, PA: Mosby Publishers; 2003. p. 3126.
3. Serin-Kilicoglu S, Erdemli E. New addition to the statin's effect. J Trauma 2007;63:187-91.
4. Human JA, Ubbink JB, Jerling JJ, Delpont R, Vermaak WJ, Vorster HH, et al. The effect of Simvastatin on the plasma antioxidant concentrations in patients with hypercholesterolaemia. Clin Chim Acta 1997;263:67-77.
5. Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Viola F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol 2000;36:427-31.
6. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Nègre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, van Hinsbergh VW. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. Circulation 2000;102:2803-9.
7. Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, Rossini G, Mundy GR. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. Osteoporos Int 2006;17:1033-42.
8. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science 1999;286:1946-9.
9. Price CP, Thompson PW. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. Ann Clin

- Biochem 1995;32:244-60.
10. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000;37:432-46.
 11. Eastell R. Assessment of bone density and bone loss. *Osteoporos Int* 1996;6 Suppl 2:3-5.
 12. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marawi F, Hannig M, et al. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 2008;147:84-91.
 13. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 1985;3:389-404.
 14. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 1991;9:383-90.
 15. Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int* 2007;18:1641-50.
 16. Skoglund B, Aspenberg P. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskeletal Disord* 2007;8:98.
 17. Fukui T, Ii M, Shoji T, Matsumoto T, Mifune Y, Kawakami Y, et al. Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. *J Bone Miner Res* 2012;27:1118-31.
 18. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, et al. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:336-42.
 19. Wang PS, Solomon DH, Mogun H, Avorn J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA* 2000;283:3211-6.
 20. Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women. *Lancet* 2000;355:2218-9.
 21. Chan KA, Andrade SE, Boles M, Buist DS, Chase GA, Donahue JG, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet* 2000;355:2185-8.
 22. Chung YS, Lee MD, Lee SK, Kim HM, Fitzpatrick LA. HMG-CoA reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1137-42.
 23. Wada Y, Nakamura Y, Koshiyama H. Lack of positive correlation between statin use and bone mineral density in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Arch Intern Med* 2000;160:2865.
 24. van Staa TP, Wegman S, de Vries F, Leufkens B, Cooper C. Use of statins and risk of fractures. *JAMA* 2001;285:1850-5.
 25. LaCroix AZ, Cauley JA, Pettinger M, Hsia J, Bauer DC, McGowan J, et al. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med* 2003;139:97-104.
 26. von Stechow D, Fish S, Yahalom D, Bab I, Chorev M, Müller R, et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskeletal Disord* 2003;4:8.
 27. Garrett IR, Gutierrez GE, Rossini G, Nyman J, McCluskey B, Flores A, et al. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. *J Orthop Res* 2007;25:1351-7.
 28. Rosenson RS, Tangney CC, Langman CB, Parker TS, Levine DM, Gordon BR. Short-term reduction in bone markers with high-dose simvastatin. *Osteoporos Int* 2005;16:1272-6.