

Pelepasan Gentamisin dari Pelet Bovine-Hydroxyapatite-Gelatin sebagai Sistem Penghantaran Obat dan Pengisi Tulang

Aniek Setiya Budiatin¹⁾, M. Zainuddin²⁾, Junaidi Khotib¹⁾, Ferdiansyah³⁾

¹⁾ Departemen Farmasi Klinik FFUA, ²⁾ Departemen Kimia Farmasi FFUA,

³⁾ Instalasi Orthopedi dan Traumatologi RSUD Dr Soetomo Surabaya
e-mail: anieksb@yahoo.co.id

Abstract

Polymethyl methacrylate (PMMA) beads releasing antibiotics are used extensively to treat osteomyelitis, but require surgical remove afterwards, because they do not degraded. Hydroxyapatite (HA)-gelatin (GEL) pellet are degradable and compatible compound with osteogenic properties, suitable for use as delivery drug and bone filler was synthesized. The pellet, which avoid bone infection, were exclusively composed with gentamicin (GEN).

The pellet BHA-GEL are synthesized from BHA (20 g), 20 ml GEL 5% and add GEN 10% . Glutaraldehyde as cross-linking agent required to control GEN released for long-time. After implanting the pellet into rabbit femur, we studied: the GEN release, determining the concentration in proximal and distal bone as a function of time, and bone growth as consequence of the pellet reactivity in the bone defect.

The therapeutic efficacy of such pellet has been demonstrated in a model of bone defect of the femur in the rabbit. After 28 days the bone defect has been closed by trabecula and osteosit. Gentamicin (GEN) incorporated in composite of HA -GEL has been shown capable of being released over a period of 28 days in concentrations sufficiently high (more than 10 MIC) to control *Staphylococcus aureus* as nosocomial bacteria.

The BHA-GEL- GEN-GA pellet proved good form as local antibiotic therapeutic and bone filler.

Keywords: BHA, Gelatin, Gentamicin, Glutaraldehyde, Degradable

PENDAHULUAN

Polymethyl-methacrylate (PMMA) sebagai pioner biomaterial yang digunakan sebagai penghantaran obat yang baik untuk terapi osteomielitis, akan tetapi karena PMMA bersifat non-degradabel dan toksik sehingga diperlukan tindakan operasi ulang untuk mengambil material tersebut setelah beberapa waktu (Faber *et al.*, 2005). Terapi osteomielitis memerlukan waktu lama dan untuk eradikasi bakteri diperlukan konsentrasi antibiotika lebih dari 10 kali MIC. Sifat nondegradabel PMMA merugikan, karena hanya obat teradsorpsi dipermukaan yang aktif sedangkan yang terjebak di dalam beads tidak dapat keluar dan sehingga menyebabkan terjadinya resistensi kuman terhadap antibiotika (El-Ghannam *et al.*, 2005). Akhir-akhir ini komposit seramik dan polimer banyak dikembangkan sebagai sistem penghantaran obat dan karena sifatnya biodegradabel, biokompatibel dan tidak toksik, sehingga dapat berfungsi sebagai pengisi tulang (Tampieri *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005, Hillig *et al.*, 2008).

Hidroksiapatit (HA) salah satu contoh seramik yang dapat diperoleh dari tulang sapi dan disebut *Bovine Hydroxyapatite* (BHA) mempunyai sifat mirip HA tulang manusia dan telah diproduksi oleh Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo Surabaya (Ferdiansyah, 2010). *Bovine Hydroxyapatite* sebagai penghantaran obat kurang optimal, karena obat hanya teradsorpsi di permukaan dan mudah terlepas, sehingga diperlukan polimer yang melapisinya sebagai obat terdispersi. Gelatin merupakan contoh polimer yang berasal dari kulit dan tulang sapi, bersifat degradabel dapat dikombinasi dengan BHA. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuat pelet dengan bahan BHA dan gelatin (GEL) yang diharapkan dapat berfungsi sebagai penghantaran gentamisin (GEN) dan pengisi defek tulang. Agar GEN dapat dilepas secara perlahan dan

terkontrol maka diperlukan suatu *cross-link agent* yaitu glutaraldehyd (Dinarvand *et al.*, 2005; Hillig *et al.*, 2008). Sediaan dicetak dalam bentuk pelet silinder dengan berat 100 mg, berdiameter 4 mm dan tebal 3,2 mm. Pelet ditanam dalam femur tulang kelinci dan dievaluasi: konsentrasi GEN yang berpenetrasi ke dalam tulang serta pertumbuhan tulang baik secara histologis dan radiologis.

BAHAN DAN METODE

Material. Bovine hydroxyapatite (BHA) diperoleh dari Bank Jaringan RSUD; GEL 150 bloom dari kulit sapi diperoleh dari Rousselot (Guangdong China), GEN dari Arshine Technology CO, Limited, Wanchai China, glutaraldehyd (GA) yang diperoleh dari Sigma-Aldrich

(1). Preparasi sampel. Bovine hydroxyapatite (BHA) (10g) ditambah GEL 5% (10 ml) dan GEN 10% diaduk sampai homogen hingga membentuk massa yang dapat dibuat granul. Granul dikeringkan selanjutnya di rendam dengan larutan glutaraldehyd (GA) 0,5% selama 24 jam. Granul dicuci sampai bebas GA dengan air suling dan dikeringkan pada suhu 40°C selama 24 jam, selanjutnya ditimbang 100,0 mg dan dicetak dalam cetakan berdiameter 4 mm dengan beban 3 ton.

(2). Implantasi pelet. Sebanyak 50 ekor kelinci dibagi menjadi 2 kelompok besar untuk pelet BHA-GEL-GEN (*non-cross-link* = NCL) dan BHA-GEL-GEN-GA (*cross-link* = CL), masing-masing dibius dengan Xylazin 3 mg/kg BB dan ketamin 20 mg/kg BB serta ampicilin 25 mg/kg BB ditambahkan sebagai antibiotika profilaksis. Bulu kelinci di sekitar femur dibersihkan dan selanjutnya dilakukan insisi lapis demi lapis sampai kelihatan tulangnya. Tulang dibor dengan mata bor 4,2 mm dan defek yang terjadi diisi dengan pelet NCL atau CL. Pengambilan sampel sebanyak 5

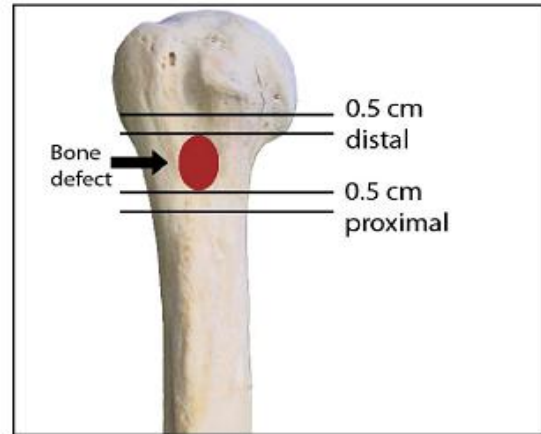
ekor kelinci dilakukan pada hari ke 2,7,14,21 dan 28. Untuk pemeriksaan konsentrasi GEN yang berpenetrasi ke dalam tulang diambil 0,5 cm ke arah proksimal dan distal seperti tersaji pada Gambar 1. Kadar GEN ditentukan secara mikrobiologi menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Unair. Evaluasi sebagai pengisi tulang untuk melihat perkembangan tulang dilakukan secara histologi dan radiologi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pelet yang dihasilkan berbentuk silinder dengan berat 100,0 mg, diameter 4,0 mm, tebal 3,2 mm dan kadar GEN 7,9 mg. Pelet dari BHA-GEL-GEN berwarna putih sedang BHA-GEL-GEN-GA berwarna coklat seperti terlihat pada Gambar 2.

Perkembangan tulang di daerah defek tulang dievaluasi secara histologis (Gambar 3) dan radiologis (Gambar 4)

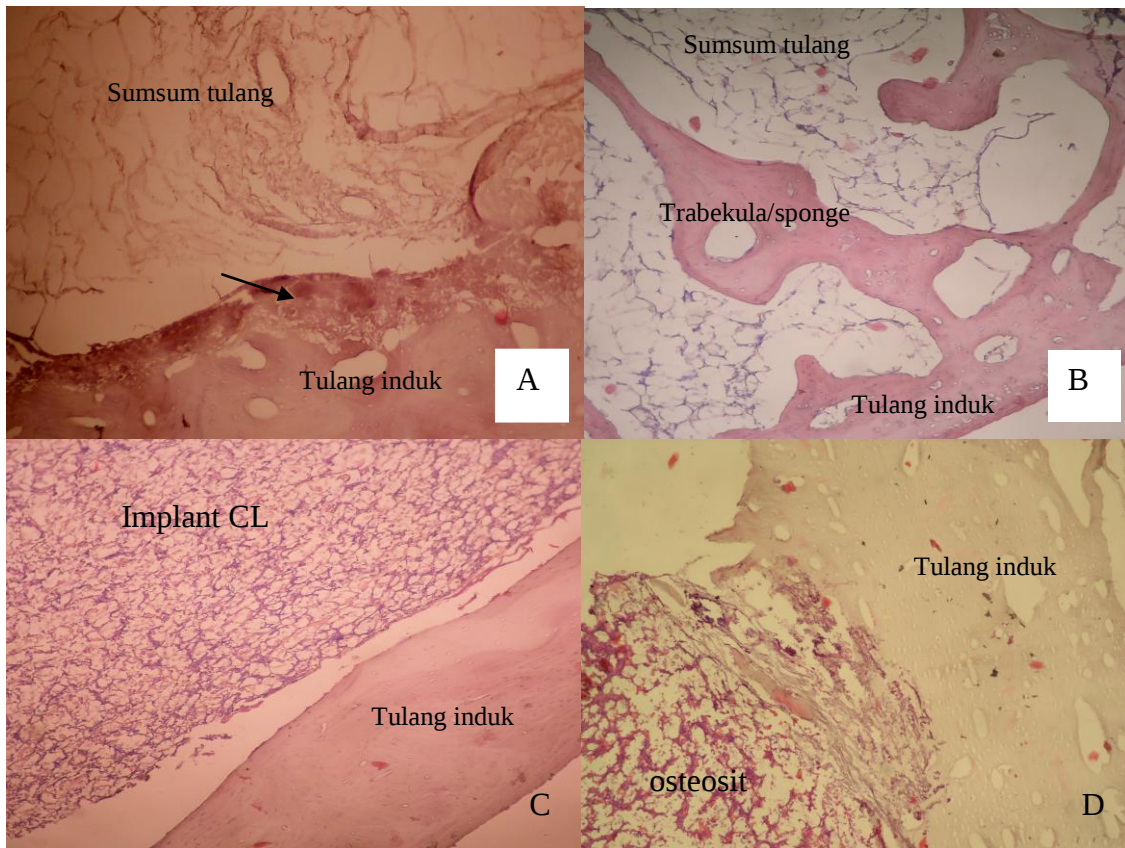
Hasil penentuan GEN yang berpenetrasi ke dalam tulang arah proksimal dan distal dari pelet NCL dan CL terlihat seperti Gambar 5



Gambar 1. Posisi pengambilan sampel untuk penentuan GEN yang berpenetrasi ke arah proksimal dan distal



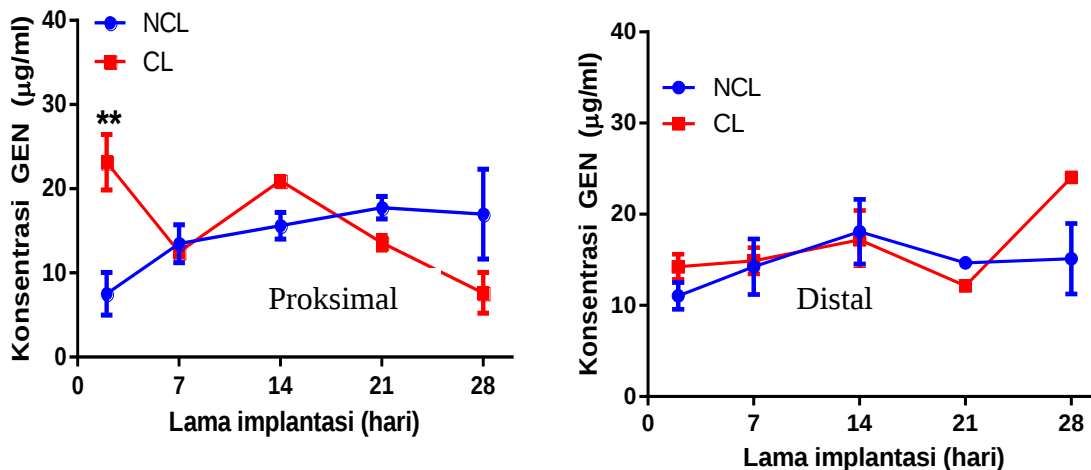
Gambar 2. Pelet BHA-GEL-GEN (A) dan Pelet BHA-GEL-GEN-GA (B)



Gambar 3. Perkembangan tulang di sekitar implan secara histopatologis: Implan NCL (A) 2 hari dan (B) 28 hari; implan CL (C) 2 hari dan (D) 28 hari.

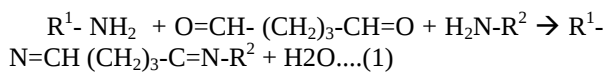


Gambar 4. Hasil X-ray perkembangan tulang di sekitar: implan NCL (A) hari ke 2, (B) hari ke 28; implan CL (C) hari ke 2 dan (D) hari ke 28 (Aniek, 2014).



Gambar 5. Profil penetrasi gentamisin (GEN) dari implan Cross-link (CL) dan Non Cross-link (NCL) yang diimplan pada tulang femur kelinci. Pengambilan sampel dilakukan 0,5 cm ke arah (A) proksimal dan (B) distal. Data merupakan rata-rata dari 3 replikasi $\pm$ SD. Analisis dengan ANOVA dua arah dengan $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan signifikan pada arah proksimal pada hari ke-2 diperoleh $** p = 0.0020$. Sedangkan pada arah distal tidak didapatkan perbedaan yang signifikan.

Warna pelet CL hasil *cross-linking* dengan GA berwarna coklat sedang pelet NCL berwarna putih (Gambar 1), sebagai hasil proses azotasi dari gugus -NH₂ dari GEL maupun GEN dengan gugus -C=O dari GA seperti terlihat pada persamaan (1) di bawah ini.



Keterangan: R¹ adalah rantai Gelatin dan R² adalah rantai gentamisin yang masing-masing komponen mempunyai gugus -NH₂ bebas yang dapat di *cross-link* dengan gugus -C=O dari glutaraldehid.

Dengan proses *cross-link* komponen GEL dan GEN oleh GA, maka akan terbentuk ikatan kovalen yang kuat antara GEL dan GEN (Ginalska *et al.*, 2005). Gelatin memiliki sifat mampu menyerap air sampai 10 kali beratnya dengan cara mengembang (*swelling*) dan dalam sistem penghantaran obat (SPO) GEL berfungsi sebagai membran yang mengatur pelepasan GEN sehingga bahan aktif dapat dilepas secara perlahan (Dinarvand *et al.*, 2005). Pada uji degradasi pelet NCL hancur dalam waktu 5 jam, sedangkan pelet CL hancur setelah 28 hari.

Pemeriksaan tulang dengan pewarnaan Haematoxilin dan Eosin dari defek tulang yang diisi implan NCL atau CL, menunjukkan perkembangan secara kualitatif dari hari ke dua sampai minggu ke 4 (Gambar 3). Pada hari ke dua pelet NCL sudah terdegradasi dan terlihat secara histopatologi timbulnya hematoma di tepi defek (Gambar 3A). Pelet CL masih kelihatan utuh (Gambar 3C), seperti uji pendahuluan secara *in vitro* bahwa pelet NCL terdegradasi secara sempurna pada jam ke 5, sedangkan pelet CL pada hari ke 28. Keuntungan implan NCL maupun CL bersifat kompatibel sehingga hasil degradasi (BHA dan GEL) dapat bersatu dengan jaringan di sekitarnya. *Bovine Hydroxyapatite* sebagai HA natural mempunyai sifat

osteokonduktif secara kualitatif lebih baik dibanding HA sintesis sehingga lebih menarik sel, meningkatkan proliferasi sel. GEL merupakan kolagen tipe 1 sebagai komponen utama penyusun osteoid atau *softcallus* (Korkusuz *et al.*, 2004; Narbat *et al.*, 2006). Perkembangan tulang di dalam defek yang diisi pelet NCL (Gambar 3B) atau CL (Gambar 3D) terlihat berbeda pada hari ke 28 sebab pelet NCL cepat terdegradasi. Gelatin sebagai komponen utama pembentuk *softcallus* akan cepat membentuk trabekula/spingiosa yang menjembatani dua sisi defek, sehingga tulang saling tersambung. Implan CL menyerap cairan tubuh, mengembang dan membentuk kanal-kanal atau terjadi vaskularisasi, sehingga mempermudah sel-sel berpenetrasi. Pembentukan osteoid lebih lambat dibanding implan NCL, tetapi proses tertutupnya defek lebih cepat pada implan CL, karena implan tetap berada di dalam defek dan mengembang bersamaan dengan terbentuknya osteoid. BHA sebagai sumber kalsium yang tidak direabsorpsi oleh osteoklas. BHA dapat berfungsi sebagai *scaffold* tempat berproliferasi dan diferensiasi sel menjadi osteosit (*hardcallus*) yang menutup defek (Aniek, 2014).

Berdasarkan hasil pengamatan dengan alat *X-ray* dapat diketahui bahwa perkembangan regenerasi/pertumbuhan tulang di sekitar implan mulai hari ke 2 dan ke 28 seperti tersaji Gambar 4 A dan 4B implantasi implan NCL serta Gambar 4C dan 4D untuk implan CL. Pada hari ke 2, terlihat bahwa bentuk defek masih bulat, karena belum terjadi regenerasi tulang. Sinar X akan terserap secara sempurna di bagian defek tulang yang berisi implan NCL (Gambar 4A) maupun CL (Gambar 4C) yang masih dalam kondisi sama bulat, tetapi implan CL lebih kelihatan bulat dari pada NCL. Implan CL masih utuh dan lebih padat, sehingga mempunyai daya serap terhadap sinar *X-ray* lebih kuat dibanding NCL yang sudah terdegradasi. Setelah 28

hari Gambar 4B menunjukkan perkembangan implan NCL yang membentuk osteoid lebih cepat dibanding CL (Gambar 4D); tetapi proses pembentukan tulang lebih baik CL, sehingga celah terlihat semakin menyempit. Implan CL yang terdegradasi secara terkontrol akan memberi kesempatan terbentuknya vaskularisasi di antara benang-benang α -heliks gelatin ter *cross-link*. Implan NCL cepat terdegradasi dan gelatin segera bereaksi dengan sel tulang membentuk osteoid (*softcallus*). BHA akan bergerak dan melekat pada tulang disekitarnya. Pertumbuhan tulang diawali dengan terbentuknya osteoid oleh osteoblas yang 90% penyusun utamanya adalah kolagen tipe 1 yang merupakan hasil degradasi GEL dalam implan. Hasil degradasi implan CL (BHA) yang mendukung proses remodeling tulang dengan membentuk osteosit. Fenomena ini merupakan suatu proses yang baik untuk mempercepat penutupan defek tulang (Rabiee *et al.*, 2009). Pertumbuhan tulang dapat dievaluasi secara semikuantitatif dari hasil pengamatan sinar X menggunakan scoring Lane & Sandhu (Korkmaz *et al.*, 2005).

Uji penetapan GEN dilakukan secara mikrobiologi, karena metode ini sangat spesifik untuk GEN sebagai antibiotika, dan digunakan *Staphylococcus aureus* sebagai model bakteri uji, karena merupakan penyebab utama terjadinya infeksi nosokomial di RS (Jamel, 2011; Kurdiana, 2013). Penetrasi GEN ke dalam tulang sepanjang 0,5 cm ke arah proksimal dan distal terlihat pada Gambar 5. Gentamisin yang diperoleh dari bagian distal dan proksimal tulang femur kelinci yang diimplantasi implan CL selanjutnya ditanam dalam *Nutrient Agar* yang mengandung *Staphylococcus aureus*. Diameter zona hambat yang terjadi diukur dan dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku untuk menghitung konsentrasi GEN. Dari hasil perhitungan diperoleh data pada hari ke 28 GEN di bagian distal mencapai konsentrasi dalam keadaan tunak (C_{ss}) = $24,03 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$. Sedangkan bagian proksimal pada hari ke 2 sudah mencapai konsentrasi tunak (C_{ss}) $23,15 \pm 5,69 \mu\text{g/ml}$. Dengan demikian implan CL lebih cepat mencapai konsentrasi dalam keadaan tunak dibanding implan NCL (Gambar 5), perbedaan tersebut signifikan dengan $p=0,0020$. Kondisi tunak dipertahankan sampai pada hari ke 28 yang terlihat dari C_{ss} ke arah distal. Konsentrasi tunak di bagian proksimal tulang pada hari ke dua, terjadi pada saat GEN yang ada di permukaan implan terlepas bersamaan dengan adanya cairan tubuh yang menyentuh implan. Aliran cairan akan tertahan oleh implan yang mengembang. Selanjutnya konsentrasi turun sampai hari ke tuju, karena aliran cairan tubuh menembus/berpenetrasi ke dalam implan untuk melarutkan GEN. GEL mempunyai daya serap yang tinggi yaitu 10 kali beratnya (Hillig *et al.*, 2008) sehingga GEN yang penetrasi ke arah proksimal minimal dan ke arah distal dipertahankan meningkat. Pada bagian distal terlihat terjadi keadaan tunak pada hari ke 28 yang menunjukkan bahwa aliran cairan tubuh melalui defek sudah terbentuk dan lancar, sehingga konsentrasi tunak tercapai. Defek yang diisi dengan implan CL terjadi vaskularisasi dengan

sempurna pada hari ke 28, membuktikan bahwa implan CL dapat mempertahankan konsentrasi pada keadaan tunak sampai hari ke 28 dan implan CL juga mempercepat terjadinya pertumbuhan tulang. Nilai total AUC distal dan proksimal adalah $AUC_{2-28\text{hari}} = (423,990 \pm 31,384 + 383,797 \pm 32,037) \mu\text{g/ml.hari} = 807,027 \mu\text{g/ml.hari}$. Pada hari ke 28, konsentrasi GEN masih tinggi, yang merupakan suatu hal yang baik. Pelepasan GEN berjalan terkontrol dalam jangka waktu lebih dari 4 minggu, karena dari beberapa literatur menyebutkan bahwa terapi osteomielitis diperlukan waktu 4 sampai 6 minggu dengan pemberiannya GEN secara intravena (Moskowitz *et al.*, 2010). Nilai AUC implan NCL = $767,965 \mu\text{g/ml.hari}$ dan CL = $807,027 \mu\text{g/ml.hari}$, terlihat nilai total AUC NCL < CL, tetapi perbedaan tersebut tidak bermakna ($p = 0,3655$). Perbedaan AUC terjadi karena implan NCL sudah terdegradasi secara total pada hari ke dua (**Gambar 3A**). Akibatnya pelepasan GEN dari implan tidak dapat dikontrol dan sebagian GEN sudah berpenetrasi lebih dari 0,5 cm dari implan baik ke arah distal maupun proksimal. Implan CL terdegradasi secara perlahan dan pelepasan GEN terkontrol secara bertahap seiring pemekaran dan kecepatan degradasi implan. Pada defek tulang terjadi devaskularisasi sehingga GEN yang berpenetrasi ke dalam tulang masih berada di sekitar implan. Di samping itu cairan yang berada dalam tulang kurang lebih 11,0 ml/100,0 gram tulang (Venugopalan *et al.*, 2007) dan alirannya juga lambat. GEN yang terlepas dari implan dan berpenetrasi ke dalam tulang lama berada disekitar implan. Gentamisin merupakan obat yang tidak dimetabolisme, sehingga GEN yang sudah berpenetrasi ke dalam tulang terdeteksi masih dalam bentuk utuh. Nilai positif dari penelitian ini adalah gentamisin yang tidak dimetabolisme dengan konsentrasi lebih dari 10 kali MIC (MIC = 0,5 ppm menurut Kaya *et al.*, 2009) akan aktif terus dan lama berada dalam tulang. Hasil ini diharapkan dapat mengeradikasi bakteri dalam tulang secara total. Kondisi yang demikian akan sukar dicapai apabila GEN diberikan secara intravena maupun oral, meskipun diberikan dalam dosis tinggi dan dalam jangka waktu lama (Nelson *et al.*, 2004; El-Ghannam *et al.*, 2005).

Darah dalam tulang femur biasanya mengalir dari bagian diafisis ke metafisis/epifisis. Dalam percobaan ini darah mengalir dari arah defek ke distal, dengan meningkatnya konsentrasi GEN di bagian distal, menunjukkan bahwa aliran darah yang menuju ke arah epifisis membaik (Meseguer-Olmo *et al.*, 2006). Dengan demikian, pelet CL mampu memperbaiki devaskularisasi akibat adanya defek tulang dan neovaskularisasi sudah terbentuk. Berdasarkan hal tersebut maka dapat diketahui bahwa proses regenerasi tulang sudah terjadi dan defek tulang telah tertutup oleh jaringan baru.

Kesimpulan. Berdasarkan besarnya GEN yang berpenetrasi ke dalam tulang dan tertutupnya defek tulang oleh pelet CL maka dapat disimpulkan: Pelet CL menunjukkan komposit yang baik sebagai sistem penghantaran GEN dan pengisi tulang pada defek tulang.

Ucapan terimakasih. Kami ucapkan terimakasih kepada Dr.Isnaeni, MS., Apt., Dra. Esti Hendradi, Apt., MSi., PhD dan Dr. Hery Soeroto, Sp.OT (K) atas segala bantuan dan saran-sarannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aniek SB., M Zainuddin, Junaidi Khotib. 2014. Biocompatible Composite as Gentamicin Delivery System for Osteomyelitis and Bone Regeneration. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 6, Issue 3, 223-226
- Dinarvand R, Mahmood S, Farbout E, et al., 2005. Preparation of gelatin microspheres containing lactic acid- Effect cross-linking on drug release, *Acta Pharmaceutica* 55: 57-67
- El-Ghannam A, Ahmed K., Omran. 2005. Nanoporous Delivery System to Treat Osteomyelitis and Regenerate Bone: Gentamicin Release Kinetic and Bactericidal Effect., *J. Biomed Mater Res Part B:Appl Biomater* 73B:277-284
- Faber C, Hoogendoorn Lyaruu DM, Stallmann HP, Marle JV, 2005. Simultaneous release of Dexamethasone and gentamicin from polymethylmethacrylate beads, *Biomaterials*, 26(28): 5717-5726
- Ferdiansyah, 2010. Regenerasi pada Massive Bone Defect dengan Bovine Hydroxyapatite sebagai Scaffold Stem sel Mesenchymal, *Desertasi*, Program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ginalska G, Kowalczyk D, Osinska M, 2005. A Chemical method of gentamicin bonding to gelatine-sealed prosthetic vascular grafts, *International Journal of Pharmaceutics* 288: 131-140
- Hillig WB, Choi S, Murtha S. 2008. An Open-Pored Gelatin/Hydroxyapatite Composite as a Potential Bone Substitute, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19: 11-17.
- Jamel Noor Fatehah. 2011. "Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien Bedah Ortopedi Arthroplasti" di SMF Ortopedi dan Traumatologi RSUD Dr Soetomo Surabaya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kaya EG, Ozbilge H and Albayrak. 2009. Determination of the Effect of Gentamicin Against *Staphylococcus aureus* by Using Microbroth Kinetic System, *Ankem Derg*, 23(3): 110-114.
- Kim Hae-Won, Yoon Byung-Ho, Kim Hyoun-Ee. 2005. Microsphere of Apatite-Gelatin Nanocomposite as Bone Regenerative Filler. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16: 1105-1109.
- Kurdiana Kamiliyah Dwi. 2013. Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien Osteomielitis" di SMF Ortopedi dan Traumatologi RSUD Dr Soetomo Surabaya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Korkmaz M, Ozturk H, Bulut O, Unsaldi T, Kaloglu C. 2005. The Effect of Definitive Continuous Distraction Employe with the Illizarov Type External Fixation System on Fracture Healing: Experimental Rabbit Model. *Acta Orthop Traumatol Turc* (3): 247-257
- Korkusuz P, Korkusuz F, 2004. Hard Tissue-Biomaterial Interactions in *Biomaterials in Orthopedics*, Yaszemski MJ, Trantolo DJ, Lewandrowski KW editor, Marcel Dekker, Inc, Chapter 1
- Moskowitz J, Blaisse M, Samuel R, Hsu HP, Harris M. 2010. The Effectiveness of the Controlled Release of Gentamicin from Polyelectrolyte Multilayers in the Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection in Rabbit Bone Model. *Biomaterials* 31 (23):6019-6030
- Meseguer-Olmo L., Nicolas-Ros MJ., Sainz-Clavel M. 2006. Biocompatibility and in vivo Gentamicin Release from Bioactive Sol-Gel Glass Implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol 61 Issue 3: 458-465.
- Narbat KM, Orang F, Hashitjin SM, Goudarzi A. 2006. Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Iranian Biomed.J*.10 (4): 215-223
- Nelson Carl L.2004. The Current Status of Material Used for Depot Delivery of Drugs. *Clinical Orthopaedics and Related Research* No 427: 72-78.
- Rabiee SM, Mortazavi SMJ, Moztarzadeh F, Sharifi D, Fakhrejahani F, Khafaf A, Houshiar Ahmadi. 2009. Association of a Synthetic Bone Graft and Bone Marrow Cell as Composite Biomaterial. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14: 1-5.
- Tampieri A, Celotti G, Landi E. 2003. Porous Phosphate-Gelatin Composite as Bone Graft with Drug Delivery Function. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14:623-627.
- Venugopalan V, Smith KM, Young MH. 2007. Selecting Anti-infective Agents for the Treatment of Bone Infections. *Orthopedics*.Volume 30. Issue 9:1-6.