

บทที่ 4

บทวิจารณ์

ปริมาณโปรตีนที่ปลดปล่อยออกในกลุ่มของ GIC+CS+AL และ GIC+AL ที่ออกมาในเวลาที่ทำการทดลองคือเวลา 2 สัปดาห์นั้นพบว่าเป็น GIC+CS+AL ปลดปล่อยโปรตีนสะสมต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักของซีเมนต์ได้ 179.05 (19.21) ไมโครกรัมต่อกรัมซีเมนต์ ส่วน GIC+AL ปลดปล่อยโปรตีนได้ 39.41 (23.12) ไมโครกรัมต่อกรัมซีเมนต์ คิดเป็นสัดส่วนที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณอัลบูมินที่เติมเข้าไปคือร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักของชิ้นทดสอบ ถ้าเปรียบเทียบกับหนึ่งหน่วยกรัมของซีเมนต์ (1,000 มิลลิกรัม) นับว่าเติมเข้าไปถึง 15 มิลลิกรัมหรือ 15,000 ไมโครกรัม เมื่อนำมาเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาคิดเป็นร้อยละเพียง 1.19 ในกลุ่ม GIC+CS+AL และร้อยละ 0.26 ในกลุ่ม GIC+AL แสดงว่ายังมีปริมาณโปรตีนที่ยังไม่ได้ปลดปล่อยออกมาอีกและยังเหลืออยู่ในก้อนพอลิเมอร์ในอัตราส่วนที่สูงทั้ง 2 กลุ่ม โดยโปรตีนที่ใส่เข้าไปในการทดลองนี้คืออัลบูมิน อาจถูกจับอยู่ข้างในพอลิเมอร์และยังไม่ถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งในการทดลองของ de la Torre และคณะ³¹ ที่ทำการทดลองโดยใช้ไคโตซานและ กรดโพลีอะคริลิกที่มีสัดส่วนต่างๆ กัน พบว่ามีการปลดปล่อยยาในระดับที่ต่างกันและคาดว่ายาหรือสารที่เติมเข้าไปมีการถูกจับอยู่ภายในพอลิเมอร์⁵³ Lee และคณะ³¹ ศึกษาการปลดปล่อยของ platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) จากไคโตซานในแต่ละแบบโดยให้เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม porous chitosan matrice, chitosan-poly (L-lactide) (PLLA) composite matrice และ chitosan coated on PLLA matrice พบว่าทั้ง 3 กลุ่มมี burst effect เหมือนกันแต่ต่างกันที่ไคโตซานมีระดับ burst effect มากที่สุดตามด้วยกลุ่ม chitosan-poly (L-lactide) (PLLA) composite matrice ส่วนกลุ่มของ chitosan coated on PLLA matrice มี burst effect ต่ำที่สุดทำให้มีเวลาในการปลดปล่อย (prolong) ได้นานที่สุดเนื่องมาจากการที่ PDGF-BB ติดอยู่ภายในโครงสร้างตาข่ายของ PLLA³¹

โดยทั่วไปการปลดปล่อยยาหรือโปรตีนจากไคโตซานหรือพอลิเมอร์มักเกิดอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาแรก สาเหตุเนื่องจากการที่มีการบวมน้ำก่อนที่จะมีการปลดปล่อย ส่งผลให้มีการปลดปล่อยในเวลาอันสั้น ทำให้เกิด burst effect เช่นเดียวกับในการทดลองนี้ที่ GIC+CS+AL มีการปลดปล่อยแบบ burst effect ในช่วงเวลาเริ่มต้นและยังคงมีการปลดปล่อยในระดับต่ำเป็นเวลานาน (sustained release) ในขณะที่กลุ่ม GIC+AL มีการปลดปล่อยแบบ burst effect แต่รูปแบบการปลดปล่อยหลังจากเกิด burst effect แล้วจะหยุดปลดปล่อยหรืออาจมีการปลดปล่อยในระดับต่ำจนไม่สามารถตรวจพบได้ที่ชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 12 และเมื่อถึงเวลาไวนานขึ้นจากชั่วโมงที่ 12 ถึง

ชั่วโมงที่ 24 สามารถตรวจพบโปรตีนได้อีก และมีการหยุดปลดปล่อยจนเมื่อชั่วโมงที่ 72 จนถึงชั่วโมงที่ 168 และชั่วโมงที่ 168 ถึงชั่วโมงที่ 336 ก็สามารถตรวจพบโปรตีนได้ในระดับที่ต่ำ ระดับโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาต่อชั่วโมงไม่มีรูปแบบที่แน่นอนและน้อยกว่าในกลุ่มของ GIC+CS+AL ขึ้นกับระยะเวลาที่แช่ ความเข้มข้นของโปรตีน หรือสารที่ผสมอยู่ในก้อนพอลิเมอร์ หรืออาจเกิดจากการ degrade ของก้อนพอลิเมอร์ ซึ่งระยะเวลาในการแช่ที่นานขึ้นมีผลต่อก้อนพอลิเมอร์ที่ดูน้ำมากขึ้นและมีการคลายของพันธะของโปรตีนในก้อนพอลิเมอร์ รวมทั้งในกลุ่มที่มีไคโตซานเป็นส่วนผสมจะมีอัตราการดูน้ำที่มากกว่ามีผลทำให้เกิดการบวมมากขึ้นและปลดปล่อยโปรตีนได้เพิ่มขึ้นจากผลการบวมนี้ ในการทดลองของ Gupta และ Ravi Kumar⁵⁴ ทำการศึกษาการปลดปล่อยที่ pH ต่างกันจะมีระดับการปลดปล่อยยาหรือโปรตีนที่ต่างกันเนื่องจากการดูน้ำที่ไม่เท่ากัน ในกรณีที่ดูน้ำมากได้มากกว่าจะมีการปลดปล่อยได้มากกว่า

การผสมกับกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ มีผลทำให้การก่อตัวของไคโตซานเร็วขึ้น และมีประโยชน์ในแง่ของการยึดติดกับเนื้อฟันหรือกระดูก⁴ ซึ่งเป็นสมบัติที่ไม่มีในไคโตซาน โดยทั่วไปสมบัติของไคโตซานในการใช้งานอาจต้องนำมาใช้ในรูปของการทำเป็น membrane, nanoparticle หรือใช้ร่วมกับตัวอื่นเพื่อช่วยในการก่อตัวและใช้เป็น matrix, scaffold และอุปกรณ์ส่งยา (devices)²⁸ ในการศึกษาชิ้นส่วนของไคโตซานที่ใช้คือ 20% โดยน้ำหนักของส่วนผสม จากการศึกษาในห้องได้เริ่มต้นจากการปรับสัดส่วนของไคโตซานตั้งแต่ 5-20% เพื่อดูว่าอิทธิพลของ ไคโตซานต่อขึ้นทดสอบเป็นอย่างไร ทั้งนี้ 20 % เป็นสัดส่วนที่วัสดุยังสามารถก่อตัวและทำงานได้ เมื่อเพิ่มเป็น 25 % วัสดุจะไม่สามารถก่อตัวได้แล้ว สำหรับขนาดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ใช้คือ 150 kDa ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ de la Torre และคณะ⁵³ ที่จัดว่าเป็นน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ Xu และ Du ศึกษาถึงอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลที่มีผลต่อการปลดปล่อยโปรตีน พบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยมีความสามารถในการปลดปล่อยที่มากกว่า อย่างไรก็ตามในการออกแบบวัสดุและรูปแบบการปลดปล่อยโปรตีน ผู้ทำการวิจัยสามารถปรับปัจจัยต่างๆ ให้การปลดปล่อยเป็นไปในระดับที่ต้องการได้⁵⁵

สำหรับกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เป็นที่ทราบว่ามีความสามารถในการปลดปล่อยไอออนได้ดีและลักษณะการปลดปล่อยก็เป็น burst effect และกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มีลักษณะที่สามารถ recharge ได้ มีการศึกษามากมายที่เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยไอออนโดยการเพิ่มความเข้มข้นของไอออนต่างๆ หรือการเพิ่มสารบางตัวเข้าไปเช่น casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate ทำให้วัสดุเพิ่มคุณสมบัติ anticariogenic potential³⁴ ในขณะที่ไคโตซานไม่มีสมบัติของการ recharge อย่างไรก็ตามส่วนประกอบที่เกิดจากการผสมไคโตซานเข้ากับกลาสไอโอโนเมอร์

ซีเมนต์อาจมีผลต่อการปลดปล่อยไอออนต่างๆ หรือไม่ รวมทั้งมีผลต่อสมบัติของการ recharge ของ กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ด้วยหรือไม่เป็นสิ่งที่ต้องศึกษาต่อไป ความสนใจในการนำเอากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ มาเป็นตัวปลดปล่อยสารมีการศึกษาอยู่เช่นเดียวกัน Lindsjo และคณะ²⁶ ได้รายงานในปี 1996 ผลการศึกษาการปลดปล่อยเมธิลีนบลู (methylene blue) จากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ โดยพบว่าเมธิลีนบลูสามารถสร้างพันธะเกิด polyelectrolyte component ในก้อนซีเมนต์ที่มีความพรุนและมีการบวมน้ำทำให้มีการปลดปล่อยสารออกมาในระดับที่แตกต่างกันในภาวะที่ค่า pH ต่างกัน คือมีการปลดปล่อยในระดับที่สูงในช่วงแรกของเวลาอันอาจเกิดจากการแพร่ธรรมดา (simple diffuse)²⁶ และมีการปลดปล่อยในระดับต่ำเป็นเวลานาน อันเกิดจากการที่ก้อนพอลิเมอร์มีการคลายพันธะออกทำให้ค่อยๆ มีการปลดปล่อยสารออกมากล้ายกับซึ้นทดสอบที่มีการผสมโคลโตซานเข้าไป

งานวิจัยที่ใช้กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เป็นตัวทำหน้าที่ carrier สำหรับการปลดปล่อยคลอร์เฮกซิดีนอะซิเตท (chlorhexidine acetate) พบว่าความเข้มข้นมีผลต่อการปลดปล่อยสาร รูปแบบการปลดปล่อยจะมีลักษณะ initial rapid หรือ burst effect ในตอนแรกและลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ระยะเวลาในการเกิด burst effect ของคลอร์เฮกซิดีนอะซิเตท ระดับความเข้มข้นต่ำมีการปลดปล่อยแบบ burst effect ในระยะเวลาที่น้อยกว่า 7 วัน ในระดับความเข้มข้นสูงสามารถปลดปล่อยได้นานกว่า 22 วัน เมื่อผ่านไป 240 วันพบว่าคลอร์เฮกซิดีนอะซิเตทความเข้มข้นต่ำถูกปลดปล่อยออกมา 3-5% และที่ความเข้มข้นสูง 11.28% มีการปลดปล่อยประมาณ 10% ของปริมาณที่ใส่เข้าไป แสดงว่ายังมีคลอร์เฮกซิดีนอะซิเตทที่ยังไม่ได้ถูกปลดปล่อยออกมาอีกเป็นปริมาณมาก²⁵

ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองคือ 2 สัปดาห์ซึ่งพบว่าในกลุ่ม GIC+CS+AL และกลุ่ม GIC+AL ยังคงมีการตรวจพบโปรตีนอยู่ และยังมีปริมาณโปรตีนที่ค้างอยู่ภายในพอลิเมอร์อีกมาก ถ้าเพิ่มระยะเวลาในการทดลองออกไป คาดว่าน่าจะยังตรวจพบโปรตีน แต่ระยะเวลาที่สิ้นสุดของการปลดปล่อยสารไม่สามารถทราบได้ ซึ่งในช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นนี้การปลดปล่อยโปรตีนอาจเกิดจากการ degrade ของซึ้นทดสอบ

จากผลการทดลองน้ำหนักที่มีการเปลี่ยนแปลงไปของซึ้นทดสอบทั้ง 3 กลุ่มพบว่าทุกกลุ่มมีการคูดน้ำแต่ในกลุ่ม GIC+CS+AL มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดตามด้วย GIC+CS อย่างไรก็ตามทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม GIC+AL ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติในการคูดน้ำของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ซึ่งมีในทั้งสามกลุ่ม และโคลโตซาน ก็เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติในการคูดน้ำ แต่อยู่ในอีกสองกลุ่มที่ให้ผลต่อสัดส่วนในการคูดน้ำได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มี อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่มีโคลโตซานทั้งสองกลุ่มมีการคูดน้ำไม่เท่ากันอาจเป็น

เพราะอัลบูมินมีผลต่อการคูดน้ำหรือไม่ โดยในการทดลองนี้ได้เก็บน้ำหนักของชิ้นทดสอบเพื่อศึกษาความโน้มถ่วง

ในการศึกษาเรื่องการปลดปล่อยโปรตีนพบว่าในกลุ่มของ GIC+CS สามารถตรวจพบว่ามีปริมาณโปรตีนออกมา แต่พบว่าเป็นปริมาณที่น้อยมากและเฉพาะช่วงเวลาเริ่มต้น และเมื่อนำไปทำ SDS PAGE ปรากฏว่าไม่พบแถบของอัลบูมินปรากฏบนแผ่นเจล ค่าปริมาณโปรตีนที่อ่านได้ดังกล่าวจึงอาจเกิดจากเป็นสารบางตัวสามารถทำปฏิกิริยากับ BSA assay หรืออาจเป็นโปรตีนขนาดเล็กจากในโคโตซานที่ได้มาจากเปลือกกุ้งซึ่งไม่ใช่อัลบูมิน ได้นำน้ำตัวอย่างไปทดสอบหาโปรตีนด้วยวิธี coomassie blue พบว่าสามารถตรวจพบโปรตีนได้เช่นกัน แสดงว่าโปรตีนที่ตรวจพบน่าจะเป็นโปรตีนขนาดเล็กจากโคโตซานและและมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า 2.5 kDa จึงไม่ปรากฏในแผ่นเจล

สำหรับกลุ่ม GIC ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีการตรวจพบโปรตีนและเมื่อนำไปทำ SDS PAGE แล้วไม่ปรากฏว่ามีแถบของโปรตีนเกิดขึ้นแสดงว่ากลุ่ม GIC ไม่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบเลย

ในเรื่องของความเป็นพิษของโคโตซานและกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เป็นที่ทราบกันว่าทั้งสองตัวนี้มีคุณสมบัติในการเข้ากับเนื้อเยื่อได้ แต่อย่างไรก็ตามวัสดุที่เกิดจากการผสมทั้งสองนี้เข้าด้วยกันแล้วอาจมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ โคโตซานอาจลดความเป็นกรดของส่วนเหลวคือกรดโพลีอะคริลิกของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์หรือวัสดุที่ผสมกันอาจมีความเป็นพิษมากขึ้นหรือไม่นั้น การทดสอบความเป็นพิษของโคโตซานและกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ใช้วิธี MTT assay โดยเตรียมชิ้นทดสอบขึ้นมาใหม่โดยไม่ได้ใช้น้ำตัวอย่างตลอดเดียวกับการหาโปรตีนในตอนที่ 1 เนื่องจากต้องการน้ำตัวอย่างที่แช่แบบสะสมที่เวลา 1, 2 และ 7 วัน ในขณะที่การทดสอบการหาโปรตีนน้ำตัวอย่างไม่ใช่เป็นแบบสะสม ผลการทดสอบพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วทั้ง 2 กลุ่มทดลองที่เวลา 1 วัน 2 วัน และ 7 วันจำนวนเซลล์จะลดลงตามเวลาที่ผ่านไปเนื่องจากเวลาที่ผ่านไปกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์สามารถปลดปล่อยความเป็นกรดและสารอื่นออกมามากในช่วงแรกเนื่องจากการที่มีส่วนผสมกับกรดโพลีอะคริลิก การแช่ชิ้นทดสอบในน้ำความเป็นกรดที่ออกมาอยู่ในน้ำที่แช่ อาจมีผลต่อเซลล์ทำให้มีเซลล์ตายเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น ในกลุ่ม GIC ที่เวลา 7 วันมีการแช่ที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นกว่า 1 และ 2 วันทำให้น้ำที่แช่อาจมีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น ในกลุ่ม GIC+CS ที่เวลา 1 และ 2 วันก็เช่นเดียวกันคือมีจำนวนเซลล์ที่รอดมากกว่า 7 วัน แต่เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติในกลุ่ม GIC+CS ที่เวลา 2 วันและ 7 วันกลับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งที่ความเป็นจริงน่าจะมีการแตกต่างกันเมื่อดูที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จะเห็นว่ากลุ่ม GIC+CS 7 วัน

เป็นกลุ่มที่มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สูงมาก การที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สูง อาจมีสาเหตุจากขั้นตอนในการทำงาน เช่นการ seed เซลล์ การเติมสารหรือน้ำตัวอย่าง

ในการทดลอง contact disc พบว่ามีเซลล์มาเกาะติดกับชิ้นทดสอบได้และปริมาณของเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ในการทดลองนี้ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าใน 24 ชั่วโมงแรกมีเซลล์ตายเป็นจำนวนมาก และการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ลดความเป็นพิษของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ลง เนื่องจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มีความเป็นกรดที่เป็นพิษต่อเซลล์ในช่วงเวลาแรก ทำให้มีเซลล์ตายจำนวนมาก การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ความเป็นพิษลดลงอาจมีส่วนทำให้เซลล์อยู่รอดได้ โดยการสังเกตพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 วันเริ่มมีเซลล์มาเกาะที่ plate ที่เวลา 7 วันมีเซลล์มาเกาะมากขึ้น ในการทดลองนี้ได้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลาถึง 21 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ค่อนข้างนาน ทำให้จำนวนเซลล์ที่นับได้ไม่แตกต่างกันเนื่องจากจะเซลล์ตายไป แต่การทดลองนี้เป็นการดูการ contact ของเซลล์ว่าสามารถมาเกาะติดหรือใกล้กับชิ้นทดสอบหรือจะเกิด inhibition zone เกิดขึ้นรอบๆ ชิ้นทดสอบหรือไม่ โดยไม่ได้ศึกษาจำนวนเซลล์เป็นหลัก

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นเพียงการเริ่มต้นความคาดหมายในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกคือนำมาใช้ในงาน pulp therapy และในงานของกระดูกและการแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นกับกระดูก (bone defect) โดยใช้เป็นตัวยึด (stabilization) กับส่วนที่นำมาฝัง (implant) ชิ้นส่วนกระดูกที่หักและการสร้างกระดูก สิ่งที่ต้องการคือให้มีการปลดปล่อยสารในระดับที่น้อยและนาน แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าความเข้มข้นที่ต้องการนำมาใช้ในทางคลินิกนานเท่าใดและต้องการเป็นระยะเวลานานเท่าไร เนื่องจากข้อควรระวังในกรณีที่นำมาใช้ในทาง pulp therapy คือถ้ามีการปลดปล่อยออกมามากไปอาจเกิดการสร้าง hard tissue ที่มากเกินไปและเกิดการอุดตัน (obliteration) ซึ่งการสร้างรูปแบบในการปลดปล่อย (control release) สามารถศึกษาหาวิธีและวัสดุเพื่อนำมาปรับรูปแบบในการปลดปล่อยให้เหมาะสมเพิ่มขึ้นต่อไปได้

ในการวิจัยนี้ก้อนพอลิเมอร์แช่อยู่ใน PBS pH 7.4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำที่มากเกินไปทำให้ก้อนพอลิเมอร์สามารถดูดน้ำได้มาก ทำให้มีการบวมน้ำและสามารถปลดปล่อยสารหรือโปรตีนออกมาได้ ในขณะที่การใช้งานทางคลินิกโดยใช้เกี่ยวกับการรักษาโพรงประสาทฟัน (pulp therapy) มีการปิดทับให้ด้วยวัสดุอุดหรือรองพื้น ตัวพอลิเมอร์จะอยู่ภายในตัวฟันไม่สัมผัสกับน้ำลาย การดูดและการบวมน้ำจะเกิดขึ้นได้น้อย ทำให้ชิ้นทดสอบมีการปลดปล่อยได้น้อยกว่าในการทดลอง ในขณะที่เดียวกันถ้าพิจารณาถึงการนำไปใช้ที่กระดูก ตำแหน่งที่อยู่ของกระดูกถ้าอยู่ในกระแสน้ำเลือดพบว่าการสัมผัสกับของเหลวมาก โอกาสที่จะปลดปล่อยสารหรือโปรตีนออกมามากกว่า นอกจากนี้ถ้าพิจารณาในแง่ของการใช้งานกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ในช่องปากที่มีน้ำลายไหล

เวียนอยู่ตลอดทำให้ความเป็นกรดลดลง กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์จึงค่อนข้างเข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี แต่ในกรณีของการรักษาโพรงประสาทฟันที่อยู่ภายในตัวฟันและวัสดุอยู่ใกล้หรือสัมผัสกับเซลล์จากโพรงประสาทฟันมากอาจมีผลที่เป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้นกว่าเดิม

ตามปกติสัดส่วนผงต่อน้ำที่บริษัทแนะนำคือ 1.2 : 1.0 สำหรับสัดส่วนผงต่อน้ำในการทดลองนี้คือ 350 : 300 มิลลิกรัมซึ่งเท่ากับ 1.16 : 1 ซึ่งต่างจากบริษัทเล็กน้อยโดยที่มีสัดส่วนของน้ำเพิ่มขึ้นอันเนื่องจากคุณสมบัติการดูดน้ำของโกลโตซาน ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ผสมแล้วได้พอเหมาะและอาจมีผลต่อสมบัติด้านกายภาพของวัสดุเช่น แรงกดอัด (compressive strength) แรงเหวี่ยง (tensile strength) ความแข็งผิว (surface hardness) แต่ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการทดสอบในเรื่องดังกล่าว

เวลาในการก่อตัวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยปกติคือเวลาประมาณ 4-5 นาทีตามคำแนะนำของผู้ผลิต แต่ในการทดลองนี้จากการสังเกตโดยไม่ได้มีเครื่องมือทดสอบพบว่าในกลุ่ม GIC แข็งที่เวลาประมาณ 5 นาที ในกลุ่ม GIC+CS แข็งเมื่อเวลาประมาณ 6 นาที ส่วนในกลุ่ม GIC+CS+AL แข็งที่เวลาประมาณ 8 นาที โดยสรุปจากการสังเกตพบว่าการเติมส่วนประกอบบางตัวลงไปขณะเดียวกันทำให้ลดส่วนของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ลงมีผลทำให้ขึ้นทดสอบใช้เวลานานขึ้นในการก่อตัว

ในการทดลองนี้ใช้ผู้ทดลองในการผสม 1 คนแต่ไม่ได้ใช้เครื่องมือพิเศษในการผสมอาจทำให้มีผลต่อการเกิดข้อผิดพลาดได้ เช่น การเกิดฟองอากาศในขณะที่ผสม การเกิดรูพรุนในขึ้นทดสอบขณะตัดใส่แบบพิมพ์ มีส่วนทำให้ผลการทดลองมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมาก ในการแก้ไขควรผสมด้วยเครื่องที่สามารถควบคุมเวลาและความแรงในการผสมได้เท่ากันทุกครั้งที่ผสม เช่น การใช้แคลปซูลและเครื่องปั่นอะมัลกัม (amalgamator) รวมทั้งการออกแบบขึ้นทดสอบให้มีความหนาลดลง

สำหรับสถิติที่ใช้ในการวิจัยนี้ใช้ Repeated Measures ANOVA ซึ่งมีฐานคติ (assumption) หลายข้อเช่นต้องมีการกระจายแบบปกติ (normal distribution), มี homogeneity และแต่ละกลุ่มต้องเป็นอิสระต่อกัน แต่ข้อมูลในการทดลองนี้มีฐานคติไม่สมบูรณ์เช่นข้อมูลบางกลุ่มไม่เป็น homogeneity แต่ Shoukri และ Edge เสนอว่าสามารถใช้ได้เพราะว่ามีผลกระทบน้อย⁵⁶