บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของโคพื้นเมืองของไทย

2.1.1 การจำแนกโคทางสัตววิทยา

โคเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีกระเพาะระบบย่อยอาหารที่พิเศษกว่าสัตว์อื่นๆ คือ มีกระเพาะย่อยอาหาร 4 กระเพาะที่สามารถย่อยอาหารจำพวกหญ้าหรือใบไม้ให้เป็นอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Fries and Ruvinsky, 1999) โคถูกมนุษย์นำมาเลี้ยงครั้งแรกในแถบประเทศยุโรป และเอเชียในช่วงยุคหินใหม่ (New Stone Age) ซึ่งก่อนหน้านั้นโคถูกมนุษย์ล่าเพื่อใช้เป็นอาหารเช่นเดียวกับสัตว์อื่น (Ensminger, 1993) มีการค้นพบฟอสซิลของโค-กระบือที่มีอายุเก่าแก่ที่สุดถึง 50-60 ล้านปี (Fries and Ruvinsky, 1999)

Blakely and Bade (1994) รายงานการจำแนกโคตามหลักสัตววิทยา มีดังนี้

Kingdom	: Animal, สัตว์
Phylum	: Chordata, มีกระดูกสันหลัง
Class	: Mammalia, เลี้ยงลูกด้วยนม
Order	: Artiodactyla, มีกีบเป็นคู่
Suborde	: Ruminantia, กระเพาะมี 4 ส่วน
Family	: Bovidae
Genus	: Bos
Species	: *Bos taurus* (อยู่ในเขตอบอุ่น, หนาว)
	Bos indicus (อยู่ในเขตร้อน)

พันธุ์โคที่เลี้ยงทั่วโลกมีประมาณ 800 พันธุ์ โดยพบว่าประมาณ 1 ใน 4 เป็นพันธุ์โคในทวีปเอเชีย และประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถจำแนกพันธุ์ได้อย่างชัดเจน พันธุ์โคทั้งหมดในเอเชียเป็นโคในกลุ่ม *Bos indicus* ที่มีลักษณะเด่นคือ มีตะโหนกจึงมักถูกเรียกว่า โคซีบู (Zebu cattle) ผิวหนังมีหลายสี มีเขาสั้น ในปัจจุบันพบว่าโคพันธุ์พื้นเมืองเอเชียมีจำนวนลดลงเนื่องจากถูกผสมข้ามพันธุ์ เมื่อโคโตเต็มวัยจะมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 200-400 กิโลกรัม (Fries and Ruvinsky, 1999)

2.1.2 ที่มาของโคพื้นเมืองไทย

โคพื้นเมืองไทยเป็นโคที่อยู่ในตระกูล *Bos indicus* ซึ่งจากหลักฐานในอดีต พอสันนิษฐานได้ว่า โคพื้นเมืองไทยสืบเชื้อสายมาจากเผ่าพันธุ์โคซึ่งมีชีวิตอยู่ในอดีตเมื่อหลายร้อยปีมาแล้ว เพราะ

ตามประวัติบรรพบุรุษของไทยนั้นปรากฏว่ามีความเกี่ยวข้องกับสัตว์ประเภทนี้มานานแต่โบราณกาล อาชีพหลักของคนไทยคือการทำนา ทำไร่ ซึ่งต้องใช้โคเป็นแรงงานลากเข็นปรับพื้นที่ทำการเกษตร และการเดินทาง เชื่อว่าโคพื้นเมืองไทยคงมีความเป็นมาพร้อมๆกับคนไทยซึ่งอาจมีการปะปนของโคจากถิ่นอื่นๆเกิดขึ้นแน่นอน แต่เป็นประวัติที่ไม่มีการบันทึก จึงไม่ทราบประวัติที่แน่นอน อย่างไรก็ตามเข้าใจว่ามีการปะปนของโคถิ่นอื่นในอัตราที่ต่ำ การปะปนของโคซึ่งนำมาจากประเทศอื่นส่วนใหญ่แล้วพบในครึ่งหลังของพุทธศตวรรษที่ 25 โคสายเลือดใหม่ๆนี้ส่วนมากเป็นโคอินเดียหรือโคแขก ซึ่งนำเข้าโดยชาวอินเดียที่อพยพเข้ามาตั้งรกรากถิ่นฐานในเมืองไทย (จรัญ จันทลักขณา, 2515)

2.1.3 การจำแนกประเภทโคพื้นเมืองไทยทางวิทยาศาสตร์

สุรชัย ชาครียรัตย์ (2545) กล่าวว่า ศาสตราจารย์ ดร.ฟิชเชอร์ (Fischer, H) ชาวเยอรมันนี ได้เดินทางเข้ามาสำรวจโคและกระบือพื้นเมืองของไทยหลายครั้ง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1967-1970 ทั้งรูปร่างลักษณะที่ปรากฏแสดงออกภายนอกและจากการศึกษาทางโครโมโซม และต่อมาศาสตราจารย์ ดร.เพน (Payne,W.J.A) ชาวอังกฤษได้เข้ามาทำการศึกษาต่อจากศาสตราจารย์ ดร.ฟิชเชอร์ สรุปได้ว่าโค พื้นเมืองของไทยรวมทั้งโคขาวลำพูนนั้นเป็นกลุ่มโคประเภทเดียวกับโคที่พบในประเทศจีน และประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งหมด โดยกลุ่มโคดังกล่าวสามารถแยกออกเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ได้ดังนี้

กลุ่มโคที่พบในประเทศจีน และเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ (China and Southeast Asia)

1) ประเภทที่ไม่มีตะโหนก (Humpless Cattle) เป็นโคที่สืบเชื้อสายมาจาก *Bos taurus* ได้แก่ โค Chinese yellow cattle

2) ประเภทที่มีตะโหนก (Humpled Cattle) เป็นโคที่สืบเชื้อสายมาจาก *Bos indicus* ได้แก่ โคพันธุ์ South Chinese Zebu และโคพันธุ์ Taiwan Zebu

3) ประเภทลูกผสมระหว่างประเภทที่มีตะโหนกและไม่มีตะโหนก เป็นโคที่สืบเชื้อสายจากต้นตระกูลของประเภทที่ 1 และ 2 ผสมกัน แตกต่างกันไปตามลักษณะทางภูมิประเทศ อาณาเขตติดต่อของพรมแดน ความนิยมจำเพาะของท้องถิ่น ซึ่งโคประเภทนี้ตามความเห็นของศาสตราจารย์ ดร.เพน นั้นสามารถจำแนกได้อีก 2 ประเภทย่อย คือ

3.1) ประเภทที่มีลักษณะประจำพันธุ์เด่นชัดที่แน่นอนแล้ว (Stabilized indigineous) ได้แก่ โคพันธุ์บาทังกัส (Batangug) ของประเทศฟิลิปปินส์ โคพันธุ์พื้นเมืองของพม่า (Burmese) ประเทศเมียนม่าร์ โคพันธุ์พื้นเมืองของอินโดจีน (Indo-chinese) เป็นโคพันธุ์พื้นเมืองที่ยังไม่ระบุแน่ชัดนัก เช่น โคพันธุ์พื้นเมืองของเวียดนาม โคพันธุ์พื้นเมืองของมาเลเซีย โคพันธุ์พื้นเมืองของไทย ซึ่งสามารถแยกย่อยไปตามเขตของภูมิภาคที่พบอีก เช่น โคชนภาคใต้ของประเทศไทย โคขาวลำพูน ซึ่งอัตราส่วนของยีนส์ที่ได้รับการถ่ายทอดจากสายเลือดโคอินเดีย (โคซีบู) มีอัตราส่วนสูงกว่าโคพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆของไทย เช่น โคขาวลำพูนสามารถพบได้ในโคชนในภาคใต้ของประเทศไทย

3.2) ประเภทที่ยังไม่มีการพัฒนาพันธุ์ (Intermedaite)

4) ประเภทที่สืบเชื้อสายมาจากโคป่า โคประเภทนี้ได้แก่ โคบาหลี โคบันเตงเกอร์หรือกระทิง เขาทุย และกูปรี

5) ประเภทลูกผสมที่อาจเกิดขึ้นจากโคประเภทที่สืบเชื้อสายมาจากโคป่ากับโคประเภทที่ 1 หรือโคประเภทที่ 2 โคประเภทนี้ได้แก่ โคพันธุ์มาดูร่า และการ์ดิ

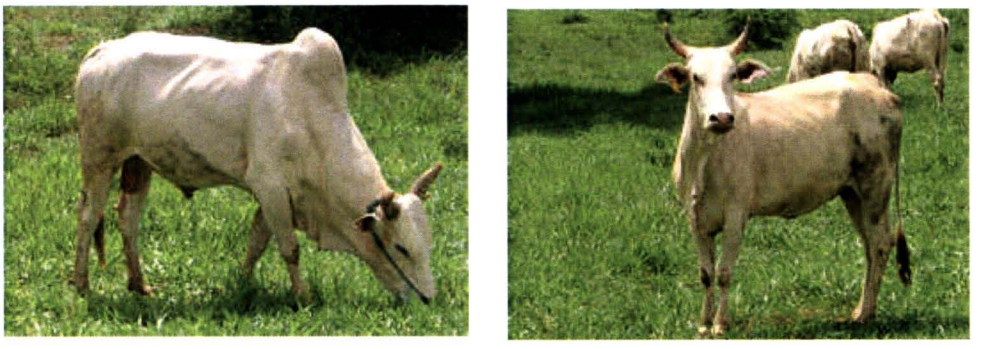
2.1.4 รูปร่างลักษณะของโคพื้นเมืองไทย

ศรเทพ ธัมวาสร (2548) กล่าวว่า โคพื้นเมืองโดยทั่วๆ ไปเป็นโคขนาดเล็ก ตัวผู้มีน้ำหนักโตเต็มที่ประมาณ 300-350 กิโลกรัม ตัวเมียมีน้ำหนักโตเต็มที่ประมาณ 200-250 กิโลกรัม หน้ายาว บอบบาง หน้าผากแคบ ตาขนาดปานกลาง ขนหน้าสั้นเกรียน จมูกแคบ ใบหูแหลม โดยทั่วไปมีเขาสั้นถึงยาวปานกลาง ตัวมักมีเขาสั้นหรือไม่มีเขา เขาโดยทั่วไปมีลักษณะตั้งขึ้นแล้วปลายงุ้มเข้า แต่ก็มีต่างกันออกไปบ้าง โคไทยมีลำคอบอบบาง ค่อนข้างยาว ใต้คอมีเหนียงคอ (dewlap) แต่เป็นแบบแคบเล็กกว่าโคอินเดีย ส่วนต่อระหว่างคอกับไหล่ค่อนข้างเห็นได้ชัด ส่วนบนหลังเหนือไหล่ (wither) มีโหนก โหนกเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อที่แทรกด้วยไขมันบาง โหนกมีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดโต ตัวเมียมีร่องรอยของโหนก แต่ไม่เด่นชัดอย่างในตัวผู้หรืออาจพูดได้ว่าตัวเมียไม่มีโหนก กระดูกขาบอบบาง ค่อนข้างยาว ข้อเท้าระหว่างกีบและแข้งค่อนข้างยาวแต่อ่อนแอ ส่วนหน้าบอบบาง มีกล้ามเนื้อน้อย ซอกขาอยู่สูงและเป็นมุมลึก เมื่อมองจากด้านหน้าหรือด้านหลังลำตัวดูป่องตรงกลาง เมื่อมองจากด้านบนพื้นที่สันหลังแคบไม่เป็นรูปสี่เหลี่ยม เป็นมุมแหลมพุ่งออกจากด้านท้ายสู่ส่วนด้านหน้า ส่วนหลังที่ค่อนไปทางซ้าย (loin) ค่อนข้างสั้น บั้นท้าย (rump) ลาดลงเล็กน้อย โคนหางสูงขึ้น หากมองจากด้านท้ายจะเห็นบั้นท้ายค่อนข้างเป็นรูปหกเหลี่ยม กล้ามเนื้อขาหลังน้อย หางเล็กแต่ยาว กล้ามเนื้อส่วนขนอ่อน (round) มีน้อย ขาหลังค่อนข้างโก่งเป็นรูปเคียวเมื่อมองจากด้านข้าง

กองบำรุงพันธุ์สัตว์ (ม.ป.ป.) จัดแบ่งโคพื้นเมืองไทยตามลักษณะรูปร่างภายนอก ตามภูมิภาคและวัตถุประสงค์ของการเลี้ยงได้ 4 สายพันธุ์ คือ

1) โคพื้นเมืองภาคเหนือ หรือโคขาวลำพูน

ขนลำตัวมีสีขาวเกรียน ผิวหนังสีชมพูส้ม ขนตามีสีขาวแต่สีนัยน์ตาดำ ขนพู่หางมีสีขาว ขอบตา เนื้อจมูก เนื้อทวารต่างมีสีชมพูส้ม ไม่มีจุดด่าง น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 350-450 กิโลกรัม และเพศเมียหนัก 300-350 กิโลกรัม พบเลี้ยงในจังหวัดลำพูน ลำปาง เชียงใหม่ พะเยา (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 โคพื้นเมืองภาคเหนือหรือโคขาวลำพูนเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

2) โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ขนลำตัวมีหลายสี ได้แก่ สีน้ำตาล น้ำตาลแดง ดำ ขนมีลักษณะสั้นเกรียน ผิวหนังสีชมพูส้ม ขนตาขนพู่หางมีสีดำหรือน้ำตาล เนื้อเขาและเนื้อกีบสีดำหรือน้ำตาลแกมดำ ขอบตา เนื้อจมูก เนื้อทวารต่างๆมีสีดำ น้ำตาลหรือน้ำตาลแกมดำ น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 350-400 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 200-250 กิโลกรัม พบเลี้ยงกระจายทั่วไปทั้งภาคอีสาน แต่เลี้ยงหนาแน่นตามเขตแนวชายแดนจังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ ศรีษะเกษ อำนาจเจริญ มุกดาหาร นครพนม และหนองคาย (ภาพที่ 2.2)

ภาพที่ 2.2 โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

3) โคพื้นเมืองภาคกลาง หรือโคลาน

ขนลำตัวมีหลายสี ได้แก่ สีน้ำตาล น้ำตาลแดง ขนมีลักษณะสั้นเกรียน ผิวหนัง ขนตาและขนพู่หางมีสีดำหรือสีน้ำตาล เนื้อเขาและเนื้อกีบมีสีดำหรือน้ำตาลดำ ขอบตา เนื้อจมูก มีสีดำน้ำตาลหรือน้ำตาลดำ มีโหนกเล็ก น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 300-350 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 200-260 กิโลกรัม พบเลี้ยงในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี (ภาพที่ 2.3)

ภาพที่ 2.3 โคพื้นเมืองภาคกลางหรือโคลานเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

4) โคพื้นเมืองภาคใต้

โคในภาคนี้ตามการสันนิษฐานกล่าวว่า อาจมีเลือดผสมจากโคแขกพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งนานมาแล้ว แต่ไม่หลักฐานที่แน่นอน โคภาคนี้มีโหนกใหญ่ บั้นท้ายเล็ก บั้นหน้าค่อนข้างใหญ่ ขนลำตัวมีหลายสีต่างๆกันน้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 350-400 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 230-280 กิโลกรัม โคในภาคนี้นอกจากเลี้ยงเพื่อใช้แรงงาน เลี้ยงเพื่อใช้เนื้อแล้วยังเลี้ยงเพื่อเกมส์กีฬาด้วย พบเลี้ยงกระจายทั่วไปในเขตภาคใต้โดยเฉพาะจังหวัดนครศรีธรรมราช ตรัง พัทลุง กระบี่ สงขลา (ภาพที่ 2.4)

ภาพที่ 2.4 โคพื้นเมืองภาคใต้หรือโคชนเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

2.2 คุณสมบัติและการแสดงออกของคาลปาสเตติน

คาลปาสเตติน (calpastatin) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในในระบบเอนไซม์คาลเปน/คาลปาสเตติน (calpain/calpastatin proteinase) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นสมาชิก 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์มิวคาลเปน (μ-calpain) และ เอนไซม์เอ็มคาลเปน (m-calpain) และโปรตีนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนทั้งสองชนิดข้างต้นที่เรียกว่า คาลปาสเตติน ระบบเอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการย่อยโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย (postmortem proteolysis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อของสัตว์ โดยเอนไซม์คาลเปนจะทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่บริเวณ Z-line เมื่อมีการปลดปล่อยแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ออกจากกล้ามเนื้อเมื่อสัตว์

ตาย แต่ในขณะเดียวกัน คาลปาสเตตินจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปน (Koohmaraie *et al.*, 1991; Koohmaraie, 1996)

2.2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมี

คาลปาสเตตินเป็นโปรตีนที่มีการค้นพบหลังจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์คาลเปน และได้รับการตั้งชื่อโดย Takashi Murachi (Murachi, 1989) จากการคัดแยกโปรตีนพบว่า โปรตีนมีขนาดผันแปรตั้งแต่ 34 กิโลดาลตัน ไปจนถึง 280-300 กิโลดาลตัน (Goll *et al.*, 1990; Maki *et al.*, 1990)

คาลปาสเตตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปน โดยสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 100°C (Goll *et al.*, 1990) และทนต่อสารซักฟอก เช่น ยูเรีย โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) และ กรดไตรคลอโรอะซิติก เป็นต้น (Geesink *et al.*, 1998; Otsuka and Goll., 1987)

คลาปาสเตตินเป็นโปรตีนตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อเอนไซม์คาลเปนเท่านั้น ไม่พบว่ามีการยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนตัวอื่นที่ทดสอบแล้ว ได้แก่ cysteine proteases, papain, cathepsin B, bromelin, ficin, trypsin, chymotrypsin, plasmin, thrombin, pepsin, cathepsin D และ thermolysin แต่อย่างไร (Crawford, 1990)

2.2.2 โครงสร้างจีโนมของยีน

ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนคาลปาสเตตินพบอยู่เพียงตำแหน่งเดียวบนโครโมโซมคู่ที่ 5 ของคน (Inazawa *et al.*, 1990) โครโมโซมคู่ที่ 2 ของสุกร (Ernst *et a.l*, 1998) โครโมโซมคู่ที่ 7 ของโคสายพันธุ์ชาโรเล่ส์ (Raynaud *et al.*, 2005b) และในหนู (Takano *et al.*, 2000) แต่โครงสร้างจีโนมของยีนคาลปาสเตตินที่สมบูรณ์ได้มีการรายงานในหนูและโคเท่านั้น ส่วนในสุกรมีรายงานโครงสร้างจีโนมของยีนนี้เพียงบางส่วน (Parr *et al.*, 2001)

ยีนคาลปาสเตตินในหนูมีความยาว 60 กิโลเบส ประกอบด้วย 34 เอกซอน (exon) โดยเอกซอน 1 จะประกอบด้วย 1xa 1xb 1y 1z และ 1u และตามด้วยเอกซอน 2 จนถึง 29 ตามลำดับ (Goll *et al.*, 2003) ส่วนยีนคาลปาสเตตินในโคนั้นประกอบไปด้วย 35 เอกซอน ครอบคลุมพื้นที่จีโนมอย่างน้อย 135 กิโลเบส (Raynaud *et al* , 2005b)

2.2.3 การแสดงออกของยีน

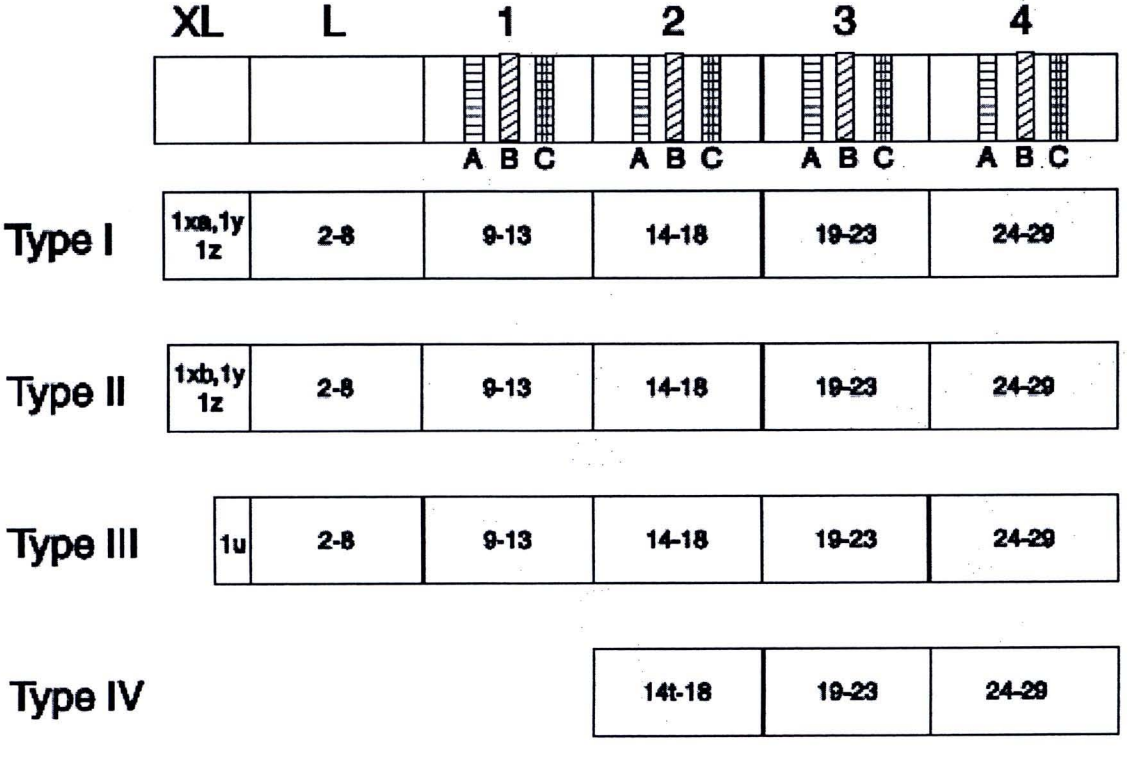
คาลปาสเตตินถอดรหัสมาจากยีนเพียง 1 ยีน สามารถถอดรหัสได้สายทรานสคริปท์ (transcript) อย่างน้อย 4 ชนิด เรียกว่า type I type II type III และ type IV (ภาพที่ 2.5) เนื่องจากมีโปรโมเตอร์ที่ต่างกันและเกิดการตัดต่ออย่างสลับ (alternative splicing) ในระหว่างกระบวนการถอดรหัส (Goll *et al.* 2003)

ทรานสคริปท์ type I ประกอบด้วย เอกซอน 1xa 1y 1z และ เอกซอน 2 จนถึง 29 พบในสมอง ตับและอัณฑะของหนู

ทรานสคริปท์ type II จะมีด้านปลาย 5' ประกอบด้วย เอกซอน 1xb 1y 1z ในส่วนนี้เมื่อแปลรหัสแล้วจะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 68 ตัว ซึ่งเรียกว่า โดเมน XL เมื่อรวมเอกซอน 2 จนถึง 29 โพลิเปปไทด์จะมีการเคลื่อนที่ในเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่ขนาด 145 กิโลดาลตัน ขณะที่น้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณจะมีขนาดเพียง 84 กิโลดาลตัน ทรานสคริปท์ชนิดที่ II นี้พบว่าปรากฏในตับและหัวใจของหนูและโค แต่สามารถพบได้เล็กน้อยในเนื้อเยื่ออื่นๆ

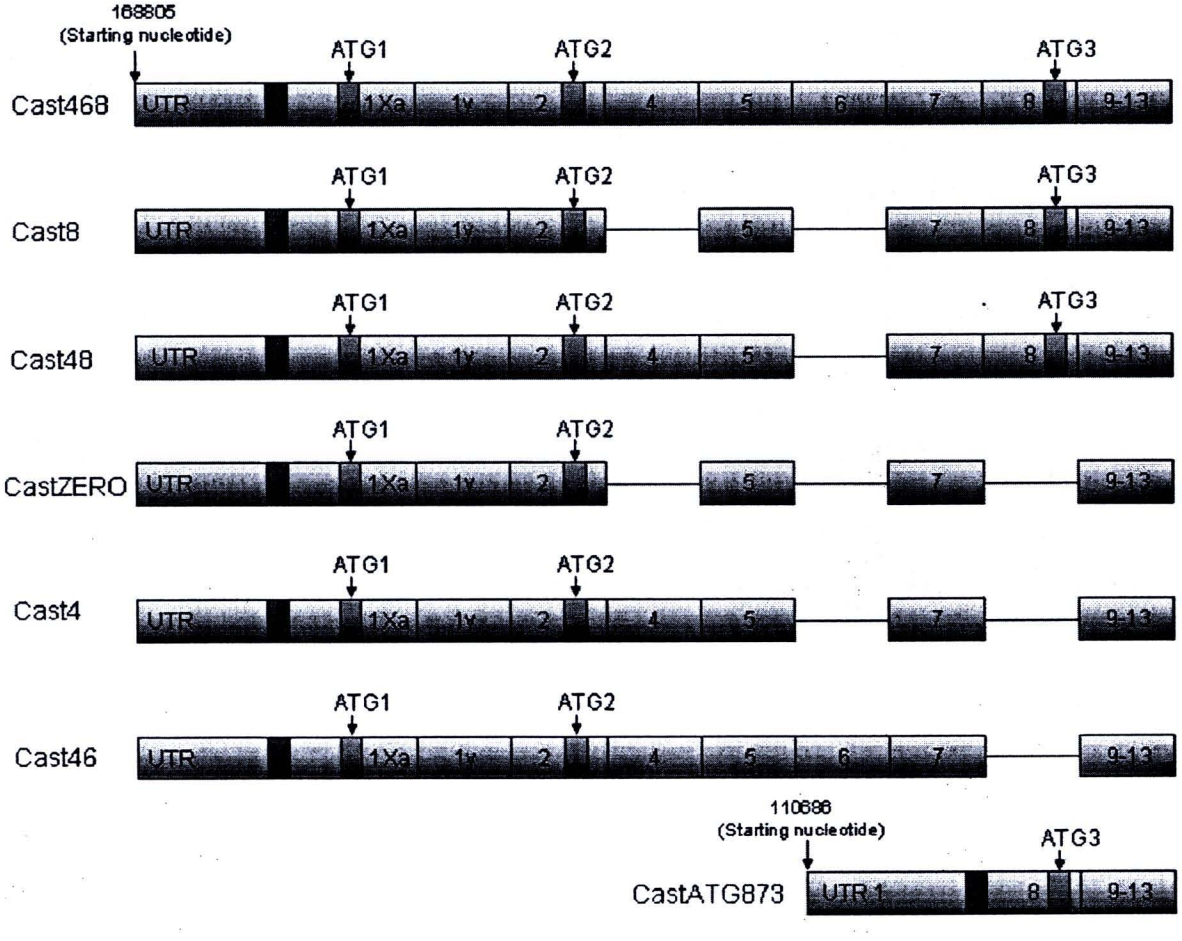
ทรานสคริปท์ type III เริ่มจากเอกซอน 1u แต่จะแปลรหัสเริ่มจากเอกซอน 2 เป็นต้นไป ทรานสคริปท์ชนิดนี้พบมีการแสดงออกในปริมาณสูงในเนื้อเยื่อทั่วไปของหนู ขณะที่ในกล้ามเนื้อสุกรพบคาลปาสเตตินชนิดนี้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น

ทรานสคริปท์ type IV เริ่มจากเอกซอน 14t เป็นเอกซอนที่อยู่ระหว่างเอกซอน 14 และ 15 คาลปาสเตตินชนิดนี้พบในอัณฑะของหนูเท่านั้น และไม่พบการแสดงออกของ type I type II หรือ type III ในอัณฑะอีกด้วย โพลิเปปไทด์จะมีการเคลื่อนที่ในเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่ขนาด 68 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของทรานสคริปท์ของยีนคาลปาสเตติน type I, II, III และ type IV หมายเลขในโครงสร้างยีนแสดงลำดับที่ของเอกซอน อักษร A B และ C แสดงส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำกันของยีนในแต่ละโดเมน (Goll *et al.* 2003)

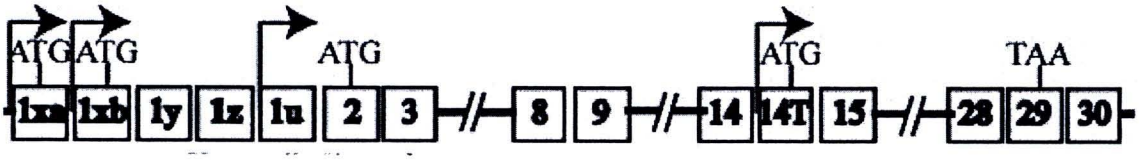
ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในสมองของหนูโดยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) พบว่า ปรากฏทรานสคริปท์ของยีนคาลปาสเตตินหลากหลายรูปแบบ โดยพบมีการตัดต่ออย่างสลับของเอกซอนที่ 4 เอกซอนที่6 และ เอกซอนที่ 8 ในโดเมน L ด้วย ซึ่งเรียกทรานสคริปท์เหล่านี้ตามตำแหน่งของจุดเริ่มต้นการแสดงออกของยีน ได้แก่ cast468 cast8 cast48 castZERO cast4 cast46, และ castATG873 (ภาพที่ 2.6) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain reaction (RT-PCR) พบการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในสมอง กล้ามเนื้อ หัวใจ และตับ ของหนู (de Tullio *et al.*, 2007)



ภาพที่ 2.6 ทรานสคริปท์ของยีนคาลปาสเตตินในสมองของหนู โดยสีแดงแสดงตำแหน่ง stop codon สีเขียวแสดงตำแหน่ง ATG codon (de Tullio *et al.*, 2007)

ในโคพบว่าการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินควบคุมโดยโปรโมเตอร์ใน 4 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดการสร้างทรานสคริปท์ 4 แบบ ซึ่งมีส่วนของยีนด้านปลาย 3' ที่เหมือนกัน แต่มีด้านปลาย 5' ที่แตกต่างกัน และเรียกว่า Type I, Type II, Type III และ Type IV ตามลำดับ (ภาพที่ 2.7) โดย Type I, Type II, Type III พบได้ใน หัวใจ กล้ามเนื้อ กระบังลม ม้ามและอัณฑะ ขณะที่ Type IV พบได้ในอัณฑะเพียงที่เดียว อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบรูปแบบการแสดงออก

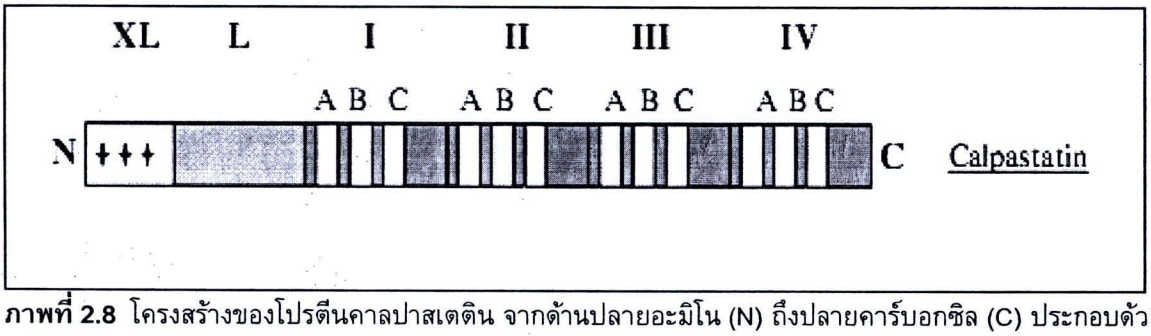
ในระดับโปรตีนในโคบ่งชี้ว่าน่าจะมีความเป็นไปได้ว่ายังมีสายทรานสคริปท์อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ (Raynaud *et al* 2005b)



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของยีนคาลปาสเตตินในโค โดยลูกศรแสดงตำแหน่งเริ่มต้นของการถอดรหัส ATG แทนตำแหน่ง start codon และ TAA แทนตำแหน่ง stop codon (Raynaud *et al* 2005b)

2.2.4 โครงสร้างของโปรตีน

โครงสร้างของคาลปาสเตตินจากด้านปลายด้าน NH_2 ประกอบด้วย 6 โดเมน (domain) ได้แก่ domain XL, domain L, domain I, domain II, domain III และ domain IV โดย domain I, II, III และ IV โดเมนที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำๆกัน (repetitive domains) และเป็น inhibitory domain ซึ่งประกอบด้วยโดเมนย่อย (subdomain) ที่ซ้ำๆกัน ได้แก่ A B และ C (ภาพที่ 2.8) (Emori *et al*,1988) ซึ่งแต่ละโดเมนสามารถยับยั้งเอนไซม์คาลเปนได้ 1 โมเลกุลในสภาวะที่มี Ca^{2+} เป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible inhibition) (Kapprell and Goll. 1989; Dargelos *et al.* 2008) โดยโดเมนย่อย A และ C จะเข้าจับกับโดเมน IV และ VI ของเอนไซม์คาลเปนตามลำดับ และส่งผลให้เอนไซม์คาลเปนไม่สามารถเข้าทำการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อได้สะดวก (Takano *et al.*, 2000; Betts *et al.*, 2003) โดเมน XL พบได้ในโค โดยโดเมน XL เรียงต่อไปจากโดเมน L ทางด้านปลายหมู่อะมิโน แต่หน้าที่การทำงานของโดเมน XL ยังไม่ได้มีการวิจัย (Cong *et al.*, 1998)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของโปรตีนคาลปาสเตติน จากด้านปลายอะมิโน (N) ถึงปลายคาร์บอกซิล (C) ประกอบด้วยโดเมน XL, L, I, II, III และ IV ตามลำดับ โดยมีโดเมนย่อย A, B และ C ซ้ำๆกันในโดเมน I ถึง IV (Dargalos *et al.* 2008)

2.2.5 การแสดงออกของโปรตีน

โปรตีนคาลปาสเตตินมีหลายไอโซฟอร์มซึ่งสร้างจากยีนที่กำหนดการสร้างคาลปาสเตตินเพียง 1 ชุด พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 17.5 จนถึง 84 kDa (กิโลดาลตัน; kilodalton) (Wang *et al.*,

1994; Imajoh *et al.*, 1987; Cong *et al.*, 1998) ซึ่งเกิดจากการควบคุมถอดรหัสโดยโปรโมเตอร์หลายตำแหน่ง รวมทั้งขบวนการตัดต่ออย่างสลับของสายอาร์เอ็นเอ และพบว่ามีอย่างน้อย 8 ไอโซฟอร์ม จำแนกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ โดยในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดจะพบอย่างน้อย 1 ไอโซฟอร์ม (Melloni *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าในเม็ดเลือดแดงของสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีย์กันจะสามารถพบไอโซฟอร์มของคาลปาสเตตินต่างรูปแบบกันอีกด้วย (Inomata *et al.*, 1993)

น้ำหนักโมเลกุลของคาลปาสเตตินที่ได้จากการคำนวณน้ำหนักของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนจะมีขนาดตั้งแต่ 68 ถึง 78 kDa ขึ้นอยู่กับขนาดของส่วนโดเมน L อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่ที่ผิดปกติบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ (SDS-PAGE) สามารถตรวจพบโปรตีนที่มีขนาดได้ตั้งแต่ 107 kDa 125 kDa 145 kDa และ 172 kDa (Goll *et al.*, 2003) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ซึ่งมีลักษณะผิดปกตินี้ทำให้ยากต่อการบ่งชี้ขนาดของไอโซฟอร์ม เช่น ไอโซฟอร์มขนาด 46.35 kDa พบว่าเคลื่อนที่อยู่ที่ตำแหน่งของขนาดโมเลกุล 70 kDa บนเจล SDS-PAGE (Takano and Murachi, 1982) โดยรวมจะพบว่าโมเลกุลของคาลปาสเตตินจะเคลื่อนที่บน SDS-PAGE ช้ากว่าขนาดโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณจากน้ำหนักของลำดับกรดอะมิโนบนสายไอโซฟอร์ม (Emori *et al.*, 1988; Takano *et al.*, 1988) การเคลื่อนที่ที่ผิดปกตินี้อาจเกิดจากคุณสมบัติของสายโปรตีนเองหรือการย่อยสลายหลังการแปลรหัสโปรตีนซึ่งจะยืนยันได้โดยการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

เอนไซม์คาลปาสเตตินมีขนาดตั้งแต่ 17 ถึง 172 kDa พบได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะที่แตกต่างกันไป มีรายงานว่า ในกล้ามเนื้อหัวใจหมู พบคาลปาสเตตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 145 kDa ซึ่งมีขนาดเท่ากับที่พบในกล้ามเนื้อโครงร่าง (Cong *et al.*, 1998)

ตารางที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุลและตำแหน่งการเคลื่อนที่บนเจลโพลิอะคริลาไมด์ของคาลปาสเตตินแต่ละไอโซฟอร์ม

ไอโซฟอร์ม	น้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณ	ตำแหน่งการเคลื่อนที่บนเจลโพลิอะคริลาไมด์
ชนิดที่ I: 1xa 1y 1z โดเมน L และ โดเมน I-IV	85 kDa	172 kDa
ชนิดที่ II: 1xb 1y 1z โดเมน L และ โดเมน I-IV	84 kDa	145 kDa
ชนิดที่ III: โดเมน L และ โดเมน I-IV	77-78 kDa	135 kDa
โดเมน L [ขาดเอกซอน 3] และ โดเมน I-IV	74-75 kDa	125 kDa
โดเมน L [ขาดเอกซอน 3 และ 6] และ โดเมน I-IV	72-73 kDa	110-115 kDa
ขาดโดเมน L และ โดเมน I	46 kDa	70 kDa
ชนิดที่ IV: ขาดโดเมน L โดเมน I และบางส่วนของโดเมน II	47 kDa	60 kDa
ขาดโดเมน L โดเมน I II และ III	18.7 kDa	ไม่ทราบ

สรุปข้อมูลจาก Goll *et al.* (2003) และ (Raynaud *et al.*, 2005a)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 5 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 246890
เลขเรียกหนังสือ

2.2.6 การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อสัตว์

ระดับของคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อนั้นอาจมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสปีชีย์ของสัตว์ (Ouali and Talmant, 1990; Koohmaraie *et al.*, 1991) สายพันธุ์ของสัตว์ (Whipple *et al.*, 1990; Shackelford *et al.*, 1991 & 1994) และ ชนิดของกล้ามเนื้อ (Koohmaraie *et al.*, 1988; Geesink *et al.*, 1992)

โปรตีนคาลปาสเตตินสามารถแบ่งได้ปีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีสายสั้น หรือ เรียกว่า erythrocyte type มีขนาดโมเลกุลประมาณ 65-70 kDa พบเฉพาะในเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่มีสายยาว หรือเรียกว่า tissue type มีขนาดโมเลกุลประมาณ 107-172 kDa พบในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ (Takano *et al*, 1988; Goll *et al.*, 2003)

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินโดยเทคนิค Western blot พบว่า สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 135 kDa ในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ได้แก่ longissimus dorsi (LD), tensor fasciae latae (TFL), semitendinosus (ST), trapezius (TZ) และ supraspinatus (SS) โดยกล้ามเนื้อชนิด trapezius ปรากฏแถบโปรตีนมีความเข้มมากที่สุด ขณะที่กล้ามเนื้อชนิด longissimus dorsi มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (Sazili *et al.*, 2005)

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในโคสายพันธุ์ซาโรเล่ย์โดยใช้แอนตี้บอดี้ที่จำเพาะต่อโดเมนที่ IV พบว่า สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 70 kDa 125 kDa และ 145 kDa ใน กล้ามเนื้อกระบังลม (diaphragm) กล้ามเนื้อชนิด *Rectus Abdominis* และ *Semi Tendinosus* โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 125 kDa มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุด ขณะที่กล้ามเนื้อหัวใจตรวจพบปริมาณไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa ในปริมาณสูงมาก นอกจากนี้ในอัณฑะของโคยังตรวจพบไอโซฟอร์มที่มีขนาด 60 kDa 70 kDa และ 145 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มที่มีขนาด 60 kDa และ 145 kDa พบการแสดงออกในปริมาณที่สูงมาก (Raynaud *et al.*, 2005a)

2.2.7 การทำงานของเอนไซม์

คาลปาสเตตินเข้าจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนโดยอาศัยแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) โดยการทำงานของคาลปาสเตตินสามารถย้อนกลับได้ (reversible) คือสามารถจับและปลดปล่อยเอนไซม์คาลเปนได้โดยไม่ทำให้เอนไซม์คาลเปนนั้นเสื่อมสภาพไป คาลปาสเตตินจะเข้าจับโมเลกุลของเอนไซม์คาลเปนที่โดเมน IV และ VI (Nishimura and Goll, 1991) โดยใช้กรดอะมิโนจำนวน 14 ตัวของโดเมนย่อย A เข้าจับโดเมน IV ของเอนไซม์คาลเปน เมื่อมีแคลเซียมอิออน โดยมีค่า *Kd* เท่ากับ 3.1 nM ขณะเดียวกันก็ใช้กรดอะมิโนจำนวน 14 ตัวของโดเมนย่อย C เข้าจับโดเมน VI ของเอนไซม์คาลเปน โดยมีค่า *Kd* เท่ากับ 31 nM (Ma *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 1995) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนจะสมบูรณ์เมื่อมีการเข้าจับโดเมนทั้งสองของเอนไซม์คาลเปน นอกจากนี้ยังพบว่าโดเมนย่อย B ของคาลปาสเตตินไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนแต่ช่วยลดการย่อยตัวเอง (autolysis) ของเอนไซม์คาลเปนได้ (Kawasaki *et al.*, 1993)

ในการทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่าปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมที่ทำให้เกิดการจับของคาลปาสเตตินและเอนไซม์คาลเปน อยู่ระหว่าง 50–400 nM ซึ่งมีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับภายในเซลล์ที่มีชีวิต (Becker *et al.*, 1989; Berlin and Konishi, 1993) จึงไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงความต้องการแคลเซียมในการทำงานของคาลปาสเตตินภายในเซลล์

2.3 ความสำคัญของคาลปาสเตติน

2.3.1 ด้านคุณภาพเนื้อ

โดยปกติภายในกล้ามเนื้อสัตว์จะมีเอนไซม์อยู่หลายชนิดด้วยกันที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อ (proteolytic enzymes) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์บางชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีผลทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นและมีรสชาติดีขึ้น โดยเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์มากที่สุด คือ เอนไซม์ในกลุ่มคาลเปน โดยพบว่าภายหลังจากสัตว์ตาย โมเลกุล ATP จะถูกใช้ไปเกือบหมด ผนังซาร์โคพลาสติคเรติคูลัมไม่สามารถกักเก็บ Ca^{2+}ไว้ได้ จึงปล่อยออกมาสู่ไซโตซอล เมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+}มากขึ้นเพียงพอสำหรับการกระตุ้นการทำงานเอนไซม์คาลเปนให้ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ บริเวณ Z line ได้แก่ titin, desmin, troponin T และ troponin I มีผลทำให้เนื้อนุ่มขึ้น ขณะเดียวกันคาลปาสเตตินจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปน (Koohmaraie, 1994; Dransfield, 1994; Warriss, 2000) การใช้สารละลาย $CaCl_2$ ฉีดเข้าในเนื้อสัตว์หลังสัตว์ตาย พบว่าเป็นการเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อและทำให้เนื้อมีความนุ่มขึ้น ขณะเดียวกันการฉีดคาลปาสเตตินกลับพบว่าเป็นการยับยั้งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อและทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง (Koohmaraie *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังรายงานว่าการใช้สาร β-adrenergic agonists มีผลทำให้อัตราการย่อยสลายของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อลดลง เนื่องจากสารตัวนี้มีส่วนทำให้ในเนื้อสัตว์มีปริมาณคาลปาสเตตินเพิ่มขึ้น จึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนและมีผลทำให้เนื้อโคมีความนุ่มลดลง (Koohmaraie *et al.*, 1991; Geesink *et al.*, 1993)

ในการศึกษาค่าการทำงานของคาลปาสเตตินหลังการฆ่าสัตว์ 24 ชั่วโมง ยืนยันได้ว่าคาลปาสเตตินทำให้เกิดความแตกต่างของความนุ่มของเนื้อโครระหว่างสายเลือด *Bos taurus* และ *Bos indicus* อย่างชัดเจน (Whipple *et al.*, 1990) การคัดเลือกโคสายเลือด *Bos indicus* ที่มีค่าการทำงานของคาลปาสเตตินต่ำจะเป็นผลต่อการได้เนื้อที่มีความนุ่มมากขึ้น (Cundiff, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติความนุ่มของเนื้อและค่าการทำงานของคาลปาสเตตินยังเป็นลักษณะที่มีอิทธิพลจากพันธุกรรมอย่างมากด้วย (Shackelford *et al.*, 1994; Wulf *et al.*, 1996)

ในสัตว์แต่ละสายพันธุ์ยังมีการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปนต่างกันด้วย ซึ่งความแตกต่างของอัตราย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและความนุ่มของเนื้อในสัตว์แต่ละชนิด อธิบายได้จากการกิจกรรมของคาลปาสเตตินที่ต่างกัน เช่น ในโคยุโรป (*Bos taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*)

จะมีอัตราย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและกิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินต่างกัน จึงทำให้มีความนุ่มต่างกันด้วย (Ouali and Talment, 1990)

การศึกษาผลของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปนที่มีต่อความนุ่มของโคลูกผสมเพศผู้ตอนระหว่างสายพันธุ์แองกัสและสายพันธุ์บราห์มัน ซึ่งมีเลือดบราห์มันในระดับต่างๆ คือ 0, 25, 37, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปริมาณของเอนไซม์คาลปาสเตตินเพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของบราห์มันสูงขึ้น (Pring *et al.*, 1997) ขณะที่ปริมาณของคาลปาสเตตินมีความสัมพันธ์กับการถ่ายทอดระดับเลือดของโคพันธุ์บราห์มัน โดยปริมาณคาลปาสเตตินจะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของบราห์มันเพิ่มขึ้น (Wheeler *et al.*, 1990)

ในการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปนในกล้ามเนื้อพับใน (*Semimembranosus*) ของโค พบว่า ภายหลังจากบ่มเนื้อได้ 7 วัน คาลปาสเตตินมีกิจกรรมการทำงานเหลืออยู่เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blotting พบว่าปรากฏแถบเอนไซม์คาลปาสเตตินที่มีขนาด 125, 91, 68 และ 42 kDa โดยแถบโปรตีนขนาด 125 kDa เป็นเอนไซม์คาลปาสเตตินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (native calpastatin) และเมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้นปรากฏว่าเอนไซม์คาลปาสเตติน ที่มีขนาด 125 และ91 kDa ได้สลายไปอย่างรวดเร็ว (Boehm *et al.*, 1998) เอนไซม์คาลปาสเตตินขนาดต่าง ๆ อาจเกิดจากการสลายตัวของเอนไซม์คาลปาสเตตินขนาด 125 kDa หรือเกิดจากกระบวนการ alternative splicing ในระหว่างการแสดงออกของยีน (Lee *et al.*, 1992a, b)

2.3.2 ด้านการแพทย์

ปัจจุบันพบว่าเอนไซม์คาลเปนมีความเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิดของมนุษย์ เนื่องจากเอนไซม์คาลเปนเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนเป้าหมายได้หลายชนิดในสภาวะที่มีแคลเซี่ยมอิออน เมื่อเอนไซม์คาลเปนมีการทำงานมากเกินกว่าสภาวะปกติ จะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนต่างๆในเนื้อเยื่อของร่างกาย และทำให้เกิดพยาธิสภาพที่อวัยวะต่างๆได้ (Goll *et al.*, 2003) การนำคาลปาสเตตินซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนมาใช้รักษาพยาธิสภาพของโรคต่างๆนับเป็นงานวิจัยที่เป็นที่สนใจอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน อาทิเช่น

ในโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer'sdisease) หรือภาวะสมองเสื่อม ซึ่งตรวจพบกลุ่มของเส้นประสาทที่เสียหรือถูกทำลายไปแล้วเรียกว่า plagues เป็นปื้นๆ และพบเซลล์ประสาท (dendrite) อยู่รอบๆ บริเวณ และในพื้นที่เดียวกันจะเป็นใยประสาทที่ยุ่งเหยิงเป็นบริเวณเรียกว่า tangle ซึ่งเป็นของสมองที่เสีย พบว่ามีปริมาณของ m-calpain มากในส่วนนิวโรไฟบริลลารี แทงเกิล (neurofibrillary tangles) ภายในตัวเซลล์ประสาทของสมองผู้ป่วย สัดส่วนของ u-calpain ที่มีการย่อยสลายตัวเองมีมากกว่าที่ไม่ย่อยสลายถึงสามเท่า และยังพบว่าปริมาณคาลปาสเตตินในสมองส่วนคอร์เท็กส่วนหน้า (frontal cortex) ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีน้อยกว่าสมองของคนปกติ

นอกจากนี้ยังพบว่าการเหนี่ยวนำให้เซลล์สมองมีสร้างคาลปาสเตตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนและทำให้เซลล์สมองกลับมาใช้งานได้ตามปกติ (Rao *et al.*, 2008)

ในโรคต้อกระจก (Cataract) เป็นภาวะที่แก้วตาหรือเลนส์ตา (lens) ภายในลูกตามีลักษณะขุ่นขาวขึ้นมีลักษณะทึบแสง ไม่ยอมให้แสงผ่านเข้าสู่ลูกตาไปรวมตัวที่จอตา (retina) พบความเข้มข้นของแคลเซี่ยมอิออนสูงถึง 1,000 uM หรือ มีการกระตุ้น m-calpain ที่มีอยู่มากในเลนส์ตา เกิดการย่อยสลายผลึก alpha และ beta และจับกลุ่มกันจนกลายเป็นต้อขึ้น เมื่อทำการทดสอบสารคาลปาสเตตินสังเคราะห์ 3 ชนิด ได้แก่ โดเมนที่ I, E64 และ SJA6017 ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปน Lp82 และ m-calpain ในเลนส์ตาของหนู พบว่า E64 และ SJA6017 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปน Lp82 ในเลนส์ตาของหนูได้ดีกว่าโดเมนที่ I (Nakamura *et al.*, 1999)

ในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อลีบ (Duchen Muscular Dystrophy: DMD) รวมทั้งในหนูทรานสจินิกที่ขาดการสร้างโปรตีน dystrophin (*mdx* mice) พบมีการเสียสมดุลของการหลั่งแคลเซียมภายในเซลล์กล้ามเนื้อ ทำให้เอนไซม์คาลเปนมีการทำงานมากกว่าปกติและทำการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้ออย่างรวดเร็ว ส่งผลให้กล้ามเนื้อลีบและอ่อนแรง เมื่อนำหนู mdx mice มาทำการถ่ายยีนคาลปาสเตตินและเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกให้มากกว่าปกติ พบว่าร่องรอยของกล้ามเนื้อตายมีขนาดลดลง เป็นไปได้ว่าสามารถนำตาลปาสเตตินมารักษาอาการกล้ามเนื้อลีบ DMD ได้ (Spencer and Mellgren, 2002)

ในโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial infarction) ซึ่งเกิดจากการอุดตันของหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ (Coronary artery) พบว่าในบริเวณที่เลือดไปเลี้ยงมีการเสียสมดุลของแคลเซียมและเกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คาลเปนที่มากเกินไป พบการสลายโปรตีน desmin and alpha-spectrin โดยปริมาณโปรตีนและอาร์เอ็นเอของ m-calpain จะสูงในช่วงแรก และปริมาณ u-calpain จะเพิ่มมากขึ้นหลังจากเกิดอาการกล้ามเนื้อหัวใจตาย นอกจากนี้ยังพบว่า Calpain inhibitor-1 สามารถลดขนาดของบริเวณอุดตันและลดการแตกหักของดีเอ็นในหัวใจหนูทดลองที่มีการอุดตันของหลอดเลือดแดงในหัวใจได้ (Iwamoto *et al.*, 1999)

ในหนูทดลองที่เยื่อไมอิลิน (myelin) รอบแอคซอนในระบบประสาทถูกทำลายทำให้การนำกระแสประสาทบกพร่อง พบสายเปบไทด์ alpha-spectrin ขนาด 150 kDa ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของเอนไซม์คาลเปนเพิ่มขึ้นถึง 50% พบว่าการใช้คาลปาสเตตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนและสามารถยับยั้งการสลายโปรตีนเส้นใยประสาท (neurofilament protein) ได้ (Posmantur *et al.*, 1997) สารยับยั้งคาลเปนชนิด MDL 28170 สามารถป้องกันการอักเสบที่เกิดจากการแตกหักของเส้นใยประสาทในไขสันหลังได้ (Kunz *et al.*, 2004) และนอกจากนี้ยังพบว่าคาลปาสเตตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนในหนูทดลองที่มีการกลายพันธุ์ของยีน Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) ซึ่งทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคระบบประสาทที่เรียกว่า Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) ได้เป็นอย่างดี (Tradewell and Durham, 2010)

ในหนูที่มีภาวะตับวายเฉียบพลัน (Acute liver failure) จากสารพิษโดยการให้สาร acetaminophen (APAP) เกินขนาด พบว่า เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของคาลปาสเตดิน โดยใช้ระบบ adenovirus สามารถยับยั้งการบาดเจ็บของตับอย่างชัดเจนและพบว่าหนูจำนวน 57% สามารถมีชีวิตอยู่ได้ (Limaye *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้เปปไทด์ของโปรตีนคาลปาสเตดินบริเวณ B ของโดเมนที่ I (CP1B) ขนาด 20 กรดอะมิโน พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของ μ-calpain ได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากกว่า cathepsin L ถึง 1000 เท่า ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยได้ (Jiao *et al.*, 2010)

จากตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าคาลปาสเตดินมีความสำคัญอย่างยิ่งในด้านการรักษาโรคไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าความสำคัญทางด้านคุณภาพเนื้อสัตว์ การสกัดโปรตีนคาลปาสเตดินจากโคพื้นเมืองมาทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานทางด้านการแพทย์ น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากโคพื้นเมืองของไทยนอกเหนือจากการบริโภคเนื้อโคได้ไม่มากก็น้อย อีกทั้งยังสามารถเพิ่มมูลค่าการตลาดของโคพื้นเมืองได้อีกเช่นกัน