

Die identifisering van fenielbottersuur aromatiese metaboliete in die urien van die blou-aap

Authors:

Wilhelmina J. van der Linde^a
Lodewyk J. Mienie^c
Jacobus J. Bergh^a
Mietha M van der Walt^b
Gisella Terre'Blanche^{a,b*}

Affiliations:

^a Farmaseutiese Chemie,
Skool vir Farmasie,
Noordwes-Universiteit,
Privaatsak X6001,
Potchefstroom 2520,
Suid-Afrika

^b Sentrum van Uitnemendheid
vir Farmaseutiese
Wetenskappe, Noordwes-
Universiteit, Privaatsak
X6001, Potchefstroom 2520,
Suid-Afrika

^c Biochemie, Skool vir
Fisiese en Chemiese
Wetenskappe, Noordwes-
Universiteit, Privaatsak
X6001, Potchefstroom 2520,
Suid-Afrika

Corresponding author:

Prof Gisella Terre'Blanche
gisella.terreblanche@nwu.
ac.za
Tel.: +27 18 299 2264
Fax: +27 18 299 4243

Dates:

Received:
Accepted: 16/04/2018
Published:

How to cite this article:

Die identifisering van
fenielbottersuur aromatiese
metaboliete in die urien
van die blou-aap, Van der
Linde, W.J., Mienie, L.J.,
Bergh, J.J., Van der Walt
M.M., Terre'Blanche, G.,
*Suid-Afrikaanse Tydskrif
vir Natuurwetenskap en
Tegnologie* 37(1)

Copyright:

Fenielbottersuur (PBA) word as 'n behandeling vir ureum sikliese defekte gebruik, as alternatiewe behandeling vir adrenoleukodistrafie en dit besit ook 'n neurobeskermende effek teen oksidatiewe stres. Bekende metaboliete van fenielbottersuur in die mens en primate is fenielasynsuur en fenielasetielglutamien, terwyl fenielasetielglisien by rotte voorkom. Tans is die metaboliet(e) wat vir fenielbottersuur se toksisiteit verantwoordelik is en die identiteit van ontbrekende metaboliete nog onbekend. Die huidige studie identifiseer en bevestig die teenwoordigheid van metaboliete, wat voorheen in beide die mens en rot se urine gevind is, in die urine van die blou-aap. Hierbenewens is aromatiese metaboliete, wat voorheen onbekend was, in die urine van die blou-aap geïdentifiseer. Hierdie nuwe metaboliete vind moontlik hul ontstaan via mono-oksigenase, dehidro-orotase en as β -oksidasie byprodukte.

Sleutelwoorde: fenielbottersuur, metaboliete, 3-hidroksifenielbottersuur, blou-aap

The identification of aromatic metabolites of phenylbutyrate in the vervet monkey.

Phenylbutyrate (PBA) is used as treatment of urea cycle disorders and as an alternative treatment option for adrenoleukodystrophy, has neuroprotective effects and provides protection against oxidative stress. Known metabolites of phenylbutyrate in humans and primates are phenylacetate and phenylacetylglutamine and in rats, phenylacetyl glycine. Neither the metabolite(s) responsible for PBA toxicity nor the identification of missing metabolites is known. This study confirms and identifies known metabolites in the urine of the vervet monkey previously found in human and rats and report the identification of new aromatic metabolites. These new metabolites originate from monooxygenase, dihydroorotase and β -oxidation byproducts.

Inleiding

Fenielbottersuur (PBA, 4-fenielbutiraat) is 'n orale, biobeskikbare, aromatiese, kortkettingvetsuur. Dit is 'n pro-geneesmiddel wat in die mitochondria van die lewer en niere na fenielasynsuur omgeskakel word deur middel van β -oksidasie. Fenielbottersuur oefen verskeie biologiese aktiwiteite uit. Aanvanklik is fenielbottersuur goedgekeur vir die behandeling van ureum sikliese defekte (Zetlin 1999), maar dit kan ook as 'n inhibeerder van die ensiem, histoon-deasetilase optree (Daosukho *et al.* 2007) en word gebruik as 'n anti-kankergeneesmiddel (Burkitt & Liungman 2008). Fenielbottersuur besit ook chemiese begeleieraktiwiteite waardeur die sellulêre ruiling van verskeie misvormde mutasieproteïene gekorrigeer word (Choi *et al.* 2008). Fenielbottersuur kan ook neurobeskermende effekte uitoefen en is betrokke by die vermindering van neuronale apoptose (Gardian *et al.* 2005). Een van die belangrikste aktiwiteite van fenielbottersuur is dat dit weefsel teen oksidatiewe stres kan beskerm (Qi *et al.* 2004) en ook tot die proliferasie van peroksisome lei (Carducci *et al.* 2001). Hierdie proliferasiemeganisme van fenielbottersuur het tot 'n alternatiewe benadering om adrenoleukodistrafie (ALD) te behandel, gelei. Die toename van peroksisome en die oor-uitdrukking van die ABCD2-geen, lei tot 'n verhoging in die vervoer van baie langkettingvetsure wat ophoop in die peroksisome, en die β -oksidasie van baie langkettingvetsure herstel (Kemp *et al.* 1998). Peroksisoomproliferasie verhoog ook katalitiese aktiwiteite om sodoende oksidatiewe stres te verlaag, wat 'n groot rol in verskeie neurodegeneratiewe siektes speel. Fenielbottersuur word oor die algemeen goed verdra, maar dit is al gevind dat hoë doserings met fenielbottersuur toksisiteit veroorsaak, dog die meganisme hiervan is nog onbekend (Carducci *et al.* 2001).

Die metabolisme van fenielbottersuur verskil in die mens, rot en hond. Soos vroeër genoem, is fenielbottersuur 'n pro-geneesmiddel wat na fenielasynsuur omgeskakel word deur

middel van β -oksidase in die mitochondria van die lewer en niere. Fenielasynsuur is 'n metaboelies-aktiewe verbinding wat konjugasie met glutamien in die mens, via asetilasie, ondergaan, om sodoende fenielasetielglutamien, wat in die urine uitgeskei word, te vorm. Die bekende fenielbottersuurmetaboliete in die mens is fenielasynsuur, fenielasetielglutamien en fenielbutirielglutamien (Comte *et al.* 2002; Batshaw, Thomas & Brusilo 1981). In die rot en hond konjugeer fenielasynsuur met glisien om fenielasetielglisien te vorm (James *et al.* 1972; Ambrose & Sherwin 1933). Fenielasetielglutamien en fenielasetielglisien is ook in die urine van primate geïdentifiseer (James *et al.* 1972). Nuwe metaboliete wat tot op hede in die mens en rot geïdentifiseer is, is byprodukte wat uit die β -oksidasieweg, of as gevolg van glukuronied-konjugasie ontstaan (Kasumov *et al.* 2004). Uit die literatuur is dit duidelik dat 'n groot deel van fenielbottersuur se metaboliete nog onbekend is en dat metaboliete ook a.g.v. hidroksilasie van die benseenring gevorm kan word (Kasumov *et al.* 2004). In die huidige studie rapporteer ons die identifisering van voorheen onbekende fenielbottersuurmetaboliete in die blou-aap en bevestig ook die teenwoordigheid van reeds geïdentifiseerde metaboliete wat in die mens en rot voorkom in die urine van die blou-aap.

Materiaal en metodes

Die huidige studie (NWU 0019-09-A5) is goedgekeur deur die Etiese Komitee vir die gebruik van diere vir eksperimentering aan die Noord-Wes Universiteit, Potchefstroom, Suid-Afrika en is uitgevoer in ooreenstemming met die riglyne soos gestipuleer deur dié etiese komitee.

Proefdier

Een vroulike blou-aap (*Cercopithecus aethiops*), 2,4–3,1 kg, van die Mediese Navorsingsraad, Tygerberg, Suid-Afrika is gebruik. Die aap is in 'n knyptang-rug, vlek-vrye staal hok gehuisves en 'n gebalanseerde dieet is gehandhaaf deur die voorsiening van vars vrugte en groente. Voedsel is twee maal per dag voorsien (9.00–9.30 vm en 3.00–3.30 nm), en water was vrylik beskikbaar (*ad libitum*). Die aap is met ongeveer 10 mg/kg ketamien hidrochloried verdoof om die hantering en versameling van urine deur middel van 'n kateter te vergemaklik. Voor behandeling is die aap geweeg en kontrole urienmonsters versamel. 'n Enkeldosering van 130 mg/kg fenielbottersuur (Berg *et al.* 2001) is in 30 ml normale soutoplossing opgelos en is vervolgens mondelings met behulp van 'n buis toegedien. Urine is in urienhouers versamel op tyd 15 minute, 30 minute, 1 uur, 2 uur, 3 uur, 7 uur en 24 uur na behandeling met fenielbottersuur. Die urine is in houers gevries tot die dag van analise.

Materiaal

Alle chemikalieë en oplosmiddels wat gebruik is vir die bepaling van die kreatinienwaardes en GC-MS analise is aangekoop by Sigma-Aldrich (Suid-Afrika).

Urien-voorbereiding

Die organiese sure in die urine is met behulp van 'n gestandaardiseerde gaschromatografie-massa-spektrometrie (GC-MS) metode bepaal (Jooste *et al.* 1994). Die urienvolume wat gebruik is vir die ekstraksie van die organiese sure is volgens elke monster se kreatinienwaardes bepaal en die gedroogde monsters is by $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gevries. Voordat die toetsmonsters in die GC-MS gespuut is, is bis-trimetielsiel-trifloorasetamied (BSTFA) en trimetiellchlorosilaan (TMCS) by die gedroogte monsters gevoeg, waarna dit vir 1 uur by $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ geïnkubeer is. Een mikroliter gederivatiseerde urienmonster is in 'n Hewlett Packard 5880 GC gespuut wat toegegerus is met 'n Hewlett Packard 5988A massaspektrometer. Organiese sure is geïdentifiseer deur gebruik te maak van standaard massachromatogramme in die Nasionale Instituut van Standaard en Tegnologie (NIST) se massaspektra biblioteek en met ChemStation[®] sagteware. Die konsentrasie van die organiese sure (mg/g kreatinien) in urine is met behulp van WsearchPro[®] sagteware bepaal.

Resultate en bespreking

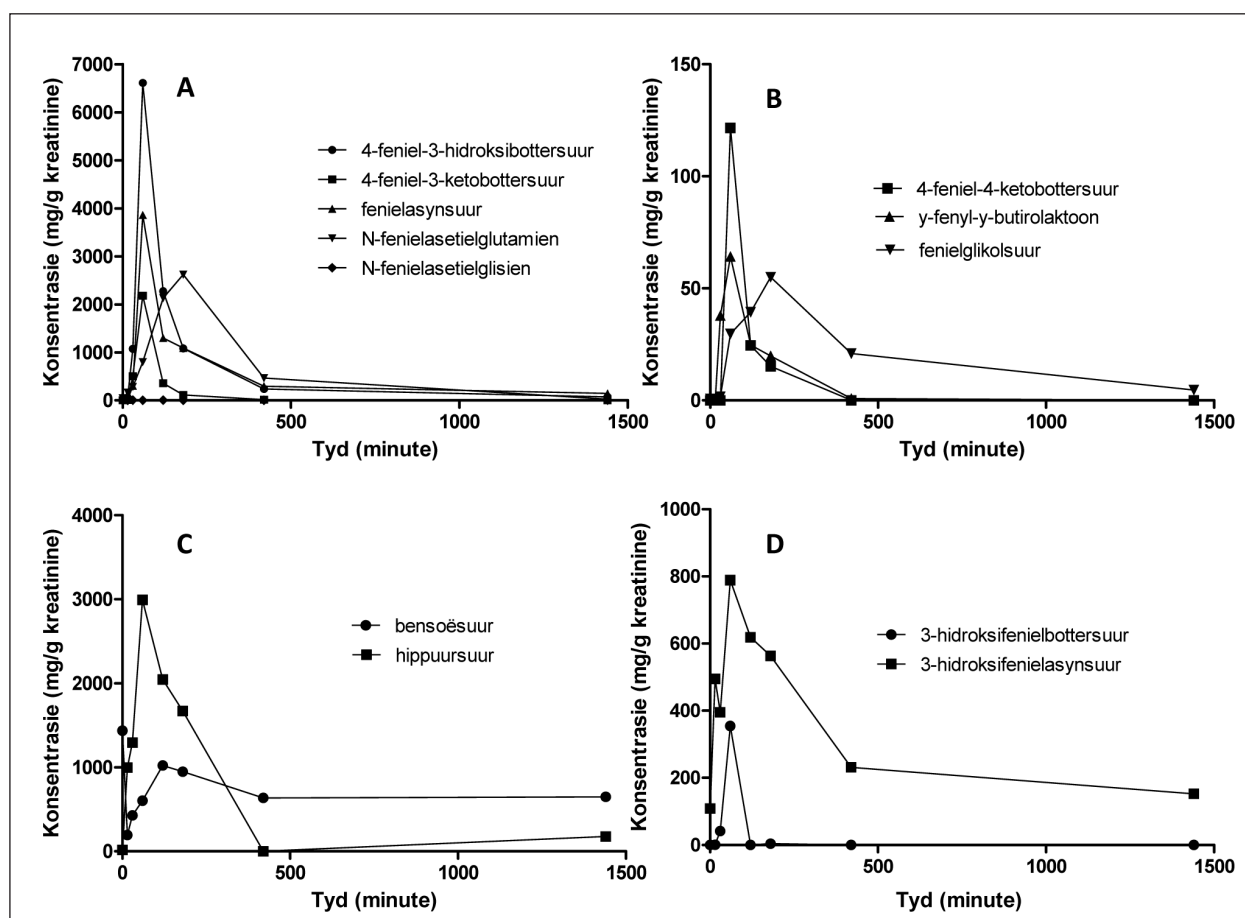
Tydens die huidige studie is spektra van meer as 200 metaboliete in die urine van die blou-aap gevind, waaronder sekere metaboliete wat voorheen deur Kasumov en medewerkers in mense en rotte gevind is (Kasumov *et al.* 2004) (Figuur 1). Verder is nuwe metaboliete ook in die blou-aap se urine geïdentifiseer (Figuur 2). Die reeds geïdentifiseerde mens- en rotmetaboliete, wat ook in die blou-aap teenwoordig was, sluit die volgende in: 4-fenielbutiriel-KoA, 4-feniel-tran s-krotoniel-KoA, S-3-hidroksi-4-fenielbutiriel-KoA, 4-feniel-3-keto-butiriel-KoA, fenielasetiel-KoA, fenielasynsuur (PA), S-(+)-3-hidroksi-4-fenielbottersuur en R-(+)-3-hidroksi-fenielbottersuur (Figuur 1). Die metaboliet, fenielasetielglisien (PAG), voorheen geïdentifiseer in rotte en primate, was in klein hoeveelhede in die blou-aap teenwoordig. Die metaboliet, 4-feniel-3-keto-bottersuur, wat voorheen slegs in rotte geïdentifiseer is, is ook in die blou-aap gevind (Figuur 1). Fenielasetielglutamien (PAGN), 'n bekende metaboliet teenwoordig in die mens en primate, is ook in die urine van die blou-aap geïdentifiseer (Figuur 1).

Figuur 2 dui die bekende metaboliete aan wat moontlik as gevolg van β -oksidase voorkom, tesame met 'n voorgestelde weg vir die nuut-geïdentifiseerde metaboliete. Twee nuwe metaboliete wat tydens dié studie geïdentifiseer is, is N-(2,6-dioksopiperidien-3-yl)-4-fenielbutanemied, wat moontlik afkomstig is vanaf fenielbutirielglutamien, deur die ensiem dihidro-orotase en N-(2,6-dioksopiperidien-3-yl)-2-fenielasetamied, vanaf N-fenielasetielglutamien, deur die ensiem, dehidro-orotase. 'n Nuwe bakteriële mono-oksigenaseweg word ook vir die metaboliete, 4-feniel-3-butenoesuur, 4-feniel-4-ketobottersuur en fenielglikolsuur (amandelsuur) (Figuur 2) voorgestel. Verder kan 4-feniel-4-hidroksibottersuur (nie in die aap gevind nie) ook gemetaboliseer word na g-feniel-g-butirolaktoon en 4-feniel-4-ketobottersuur. Op sy beurt kan 4-feniel-4-ketobottersuur metaboliseer na bensoësuur, wat vervolgens na hippuursuur, deur die ensiem glisien N-asilase, gemetaboliseer kan word.

Verdere navorsing het aangetoon dat 4-feniel-3-butenoesuur, die ensiem, peptidielglisien- α -hidroksilering mono-oksigenase, *in vivo* inhibeer (Driscoll *et al.* 2000). Hierbenewens het hulle vasgestel dat 4-feniel-3-butenoesuur self ook 'n substraat vir dié ensiem is, wat gehidroksileerde produkte soos 2-hidroksi-4-feniel-3-butenoesuur en 4-hidroksi-4-feniel-2-butenoesuur oplewer, maar hierdie produkte is nie tydens die huidige studie geïdentifiseer nie. Nog 'n metaboliet wat moontlik sy oorsprong via mikrobiese P450 mono-oksigenase vanaf fenielasynsuur vind, is fenielglikolsuur (amandelsuur), wat op sy beurt verder na bensoëlmieresuur gemetaboliseer word (Figuur 2).

Figuur 3 toon die konsentrasie van 'n paar bekende en nuut-geïdentifiseerde metaboliete wat in die urien van die blou-aap uitgeskei word, gemeet teenoor tyd. Die konsentrasie van 4-feniel-3-hidroksibottersuur, 4-feniel-3-ketobottersuur en fenielasynsuur (Figuur 3A) bereik 'n piek 60 minute na behandeling, terwyl fenielasetielglutamien (Figuur 3A) op 180 minute en fenielasetielglisien (Figuur 3A) op 120 minute 'n piekkonsentrasie bereik. Fenielbottersuur (PBS) het 'n halfleeftyd tussen 1 en 2 ure (Gondcaille *et al.* 2005) en dit word ook in Figuur 3 bevestig waar die meeste metaboliete hul piek 60 minute nadat fenielbottersuur toegedien is bereik en dan na 400 minute na die basislyn terugkeer.

Die konsentrasie van γ -feniel- γ -butirolaktoon en 4-feniel-4-ketobottersuur (Figuur 3B) het na 60 minute 'n piek bereik met kreatinienwaardes van 64.28 en 121.61 mg/g respektiewelik terwyl die konsentrasie van fenielglikolsuur (amandelsuur) (Figuur 3B) se piek na 180 minute was (54.98 mg/g kreatinien). Al die metaboliete se konsentrasies het na 400 minute na die basislyn teruggekeer. Hippuursuur, afkomstig van bensoësuur deur die ensiem glisien N-asilase, se konsentrasie (Figuur 3C) het na 60 minute 'n piek bereik (2993.00 mg/g kreatinien) en na 420 minute was daar nie meer hippuursuur teenwoordig nie, maar na 1440 minute is 'n verhoging van kreatinien wel waargeneem (177.11 mg/g kreatinien). Die vorming van 3-hidroksifenielbottersuur is ook waargeneem en kan moontlik toegeskryf word aan tirosien-hidroksilasie van fenielbottersuur. Alhoewel 3-hidroksifenielbottersuur ook β -oksidasie en mono-oksigenase kan ondergaan, is hierdie intermedieë oksidasie-metaboliete nie tydens die studie geïdentifiseer nie, behalwe 3-hidroksifenielasynsuur afkomstig van β -oksidasie (Figuur 3D). Beide 3-hidroksifenielbottersuur en 3-hidroksifenielasynsuur het ook 'n piekkonsentrasie na 60 minute bereik (354.49 mg/g en 788.85 mg/g kreatinien onderskeidelik), waarna die konsentrasie van 3-hidroksifenielbottersuur binne 120 minute na die basislyn teruggekeer het, terwyl 3-hidroksifenielasynsuurkonsentrasies binne 2 dae geleidelik teruggekeer het (Figuur 3D). Verskeie



FIGUUR 3: Die konsentrasie (mg/g kreatinine) van (A) reeds bekende en nuut-geïdentifiseerde metaboliete van fenielbottersuur in die urien van die blou-aap teenoor tyd: (B) fenielglikolsuur (amandelsuur), γ -feniel- γ -butirolaktoon, feniel-4-ketobottersuur, (C) bensoësuur, hippuursuur, (D) 3-hidroksifenielbottersuur, 3-hidroksifenielasynsuur.

mikrobiese aromatiese suurmetaboliete is ook geïdentifiseer, byvoorbeeld, 3,4-dihydrofenielpropioonsuur en 3-hidroksifenielpropioonsuur (Konishi & Kobayashi 2004).

Slot

Die huidige studie het gepoog om bekende en nuwe metaboliete van fenielbottersuur in die blou-aap te identifiseer. Metaboliete wat voorheen deur Kasumov en medewerkers in die mens en rot geïdentifiseer is, is met die huidige studie in die blou-aap se urine gevind en bevestig (Kasumov *et al.* 2004) (Figuur 1). Drie nuwe metaboliete, naamlik N-(2,6-dioksopiperidien-3-yl)-4-fenielbutanemied, N-(2,6-dioksopiperidien-3-yl)-2-fenielasetamied en 3-hidroksiefenielbottersuur is geïdentifiseer. Verder is addisionele, nuwe metaboliete, moontlik afkomstig vanaf 'n mono-oksigenaseweg, geïdentifiseer. Dit sluit in: 4-feniel-3-butenoesuur, 4-feniel-4-ketobottersuur, fenielglikolsuur, bensooesuur, hippuursuur en g-feniel-g-butirolaktoon. Die identifisering van hierdie nuwe metaboliete maak die deur oop vir verdere studies om die moontlikheid te ondersoek of een of meer van hierdie aktiewe metaboliete dalk vir sommige van fenielbottersuur se aktiwiteite verantwoordelik mag wees. Toekomstige navorsing moet op die identifisering van metaboliese strukture, afkomstig van β -oksidase van 3-hidroksiefenielbottersuur en die mikrobiese mono-oksigenaseweg fokus, asook die sintese van geïdentifiseerde metaboliete om sodoende te bepaal watter metaboliet(e) 'n bydrae tot die aktiwiteit en/of toksisiteit van fenielbottersuur lewer.

Erkenning

Ons bedank graag vir Cor Bester en Antoinette Fick by die Vivarium, Noordwes Universiteit, vir die welstand van die blou-aap en die Potchefstroom Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Foute vir die gebruik van hul aparate. Hierdie studie is gedeeltelik deur die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns, asook deur die Nasionale Navorsingstigting (TTK2007042400002), Suid-Afrika gefinansier. Die beurshouers erken hiermee dat die opinies, resultate en gevolgtrekkings of aanbevelings wat gemaak is in die artikel, slegs dié van die outeurs weerspieël en dat die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns, asook die NNS, nie verantwoordelik gehou kan word vir die inhoud nie.

Mededingende belange:

Die outeurs verklaar dat hulle geen finansiële of persoonlike verhouding(s) het wat hulle op 'n voordelige of nadelige wyse by die skryf van die artikel beïnvloed het nie.

Outeursbydrae

GT was die projekteier. Proefdiehantering en dosering is deur GT en WJvdL gedoen. Urienvoorbereiding en

organiese analise is deur WJvdL en LJM uitgevoer. Die interpretering van die data is deur LJM en GT hanteer, terwyl GT en LJM die studie ontwerp het. GT, LJM, JJB en MMvdW het die artikel geskryf.

Literatuurverwysings

- Ambrose, A.M., Sherwin, C.P., 1933, 'Further studies on the detoxication of phenylacetic acid', *Journal of Biology Chemistry* 101, 669–675.
- Batshaw, M.L., Thomas, G.H., Brusilo, S.W., 1981, 'New approaches to the diagnosis and treatment of inborn errors of urea synthesis', *Pediatrics* 68, 290–297.
- Berg, S., Serabe, B., Aleksic, A., Bomgaars, L., McGuffey, L., Dauser, R., *et al.*, 2001, 'Pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of phenylacetate and phenylbutyrate in the nonhuman primate', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47, 385–90.
- Burkitt, K., Liungman, M., 2008, 'Phenylbutyrate interferes with the Fanconi anemia and BRCA pathway and sensitizes head and neck cancer cells to cisplatin', *Molecular Cancer* 7, 1–9.
- Carducci, M.A., Gilbert, J., Bowling, M.K., Noe, D., Eisenberger, M.A., Sinibaldi, V., *et al.*, 2001, 'A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on a 120-h infusion schedule', *Clinical Cancer Research* 7, 3047–3055.
- Choi, S-E., Lee, Y-J., Jang, H-J., Lee, K-W., Kim, Y-S., Jun, H-S., *et al.*, 2008, 'A chemical chaperone PBA ameliorates palmitate-induced inhibition of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)', *Archives of Biochemistry and Biophysics* 475, 109–114.
- Comte, B., Kasumov, T., Pierce, B.A., Puchowicz, M.A., Scott, M.E., Dahms, W., *et al.*, 'Identification of phenylbutyrylglutamine, a new metabolite of phenylbutyrate metabolism in humans', *Journal of Mass Spectrometry* 37, 581–590.
- Daosukho, C., Chen, Y., Noel, T., Sompol, P., Nithipongvanitch, R., Velez JM., *et al.*, 2007, 'Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against Adriamycin-induced cardiac injury', *Free Radical and Biology Medicine* 42, 1818–1825.
- Driscoll, W.J., König, S., Fales, H.M., Pannell, L.K., Eipper, B.A., Mueller, G.P., *et al.*, 2000, 'Peptidylglycine-alpha-hydroxylating monooxygenase generates two hydroxylated products from its mechanism-based suicide substrate, 4-phenyl-3-butenic acid', *Biochemistry* 39, 8007–16.
- Ebbel, E.N., Leymarie, N., Schiavo, S., Sharma, S., Gevorkian, S., Hersch, S., *et al.*, 'Identification of Phenylbutyrate-Generated Metabolites in Huntington Disease Patients using Parallel LC/EC-array/MS and Off-line Tandem MS', *Analytical Biochemistry* 399, 152–161.
- Gardian, G., Browne, S.E., Choi, D-K., Klivenyi, P., Gregorio, J., Kubilus, J.K., *et al.*, 2005, 'Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease', *The Journal of Biological Chemistry* 280, 556–563.
- Gondcaille, C., Depreter, M., Fourcade, S., Lecca, M.R., Leclercq, S., Martin, P.G.P., *et al.*, 2005, 'Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator', *The Journal of Cell Biology* 169, 93–104.
- James, M.O., Smith, R.L., Williams, R.T., Reidenberg, M., 1972, 'The conjugation of phenylacetic acid in man, sub-human primates and some non-primate species', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 82, 25–35.
- Jooste, S., Erasmus, E., Mienie, L.J., de Wet, W.J., Gibson, K.M., 1994, 'The detection of 3-methylglutaryl carnitine and a new dicarboxylic conjugate, 3-methylglutaconyl carnitine, in 3-methylglutaconic aciduria', *Clinica Chimica Acta* 230, 1–8.
- Kasumov, T., Brunengraber, L.L., Comte, B., Puchowicz MA, Jobbins K, Thoma K, *et al.*, 2004, 'New secondary metabolites of phenylbutyrate in humans and rats', *Drug Metabolism and Disposition* 32, 10–19.
- Kemp, S., Wei, H-M., Lu, J-F., Braiterman, L., McGuinness, M.C., Moser, A.B., *et al.*, 1998, 'Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy', *Nature Medicine* 4, 1261–1268.
- Konishi, Y., Kobayashi, S., 2004, 'Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6418–24.
- Qi, X., Hosoi, T., Okuma, Y., Kaneko, M., Nomura, Y., 2004, 'Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury', *Molecular Pharmacology* 66, 899–908.
- Zeitlin, P.L., 1999, 'Novel pharmacologic therapies for cystic fibrosis', *Journal of Clinical Investigation* 103, 447–452.