

Застосування інтервального гіпоксичного тренування та олії амаранту за умов хронічної фторидної інтоксикації

У.В. Коник¹, Л.П. Козак²

¹ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ; e-mail: uvkonyk@gmail.com

² Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; e-mail: kozak.l.p.lnmu@gmail.com

Вивчення дії екологічних факторів та можливостей корекції їхнього впливу особливо під час війни не може відбуватися без урахування змін енергетичного обміну організму. Останнім часом інтервальне гіпоксичне тренування (ІГТ) широко використовується для висотної преакліматизації, лікування різноманітних клінічних захворювань, а також у спорті. Олії амаранту властива антиоксидантна, мембранопротекторна дія. Тому можливим є застосування її для підтримання структурно-функціональної цілісності клітинних та субклітинних мембран при фторидній інтоксикації. Метою нашого дослідження було оцінити зміни морфологічних характеристик тканин печінки та стан енергетичного обміну у щурів із хронічною фторидною інтоксикацією, що піддавались ІГТ та отримували амарантову олію як харчову добавку. Хронічну фторидну інтоксикацію викликали щоденним пероральним введенням натрію фториду у дозі 10 мг/кг упродовж 30 днів. ІГТ проводили у барокамері у такому режимі: п'ятиразове піднімання тварин на висоту 3000 м по 10 хв. Перерви між сеансами гіпоксії – 15 хв, тривалість тренування 10 днів. Одночасно тварини споживали додану до їжі олію амаранту в дозі 38 мг/кг упродовж 10 днів. Матеріалом для електронної мікроскопії була печінка. Виявлено, що ІГТ та олія амаранту сприяли нормалізації енергетичного обміну та ультраструктури печінки при хронічній фторидній інтоксикації. Ультраструктурна організація синусоїдальних гемокапілярів, жовчаних гемокапілярів та цитоплазми гепатоцитів може вказувати на потужний коригуючий ефект комплексного впливу ІГТ та олії амаранту при фторидній інтоксикації. Одночасне їх застосування при хронічній дії фторидів призводило до нормалізації енергетичного обміну та повного відновлення структури елементів органів унаслідок достатнього посилення внутрішньоклітинної репаративної регенерації. На основі біохімічних показників та ультраструктурних характеристик доведена висока ефективність поєданого застосування ІГТ та олії амаранту при пошкодженні структури та функції органів і клітин обґрунтовує доцільність включення цих чинників у комплексну корекцію обмінних процесів за умов фторидної інтоксикації. Ключові слова: хронічна фторидна інтоксикація; інтервальне гіпоксичне тренування; олія амаранту; енергетичний обмін; печінка; ультраструктура.

ВСТУП

Вивчення дії екологічних факторів та можливостей корекції їхнього впливу особливо під час війни не може відбуватися без урахування змін енергетичного обміну організму. Останній через сукупність метаболічних реакцій здатний забезпечити високу ефективність життєдіяльності і функціонування структурно-метаболічних систем організму

та його адаптаційний розвиток [1]. Метод інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ) забезпечує неспецифічну резистентність до дії різного генезу та сили екстремальних чинників [2, 3]. При цьому ефективність визначається вибором адекватних режимів тренування, які оптимізують метаболічні перетворення при адаптації до змін кисневих режимів гіпоксія-реоксигенація. Відомо про

здатність олії амаранту інтенсифікувати обмінні процеси та використання її складових компонентів як субстратів енергетичного обміну при дії екстремальних чинників [4]. Зокрема, гострий вплив гіпоксії на експериментальних тварин, попередньо годуваних олією амаранту, зумовив зменшення інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів у високорезистентних тварин порівняно з контролем. Олії амаранту властива антиоксидантна, мембранопротекторна дія. Тому можливим є підтримання структурно-функціональної цілісності клітинних та субклітинних мембран при фторидній інтоксикації застосуванням олії з насіння амаранту [5].

Метою нашої роботи було дослідити морфологічні характеристики тканин печінки та стан енергетичного обміну у щурів із хронічною фторидною інтоксикацією, що піддавались ІГТ та отримували амарантову олію як харчову добавку.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 40 білих щурах-самцях. Тварин утримували у стандартних умовах віварію, при звичайному харчовому та світловому режимах. Тварини 1-ої групи слугували інтактним контролем. Тварин 2-ї групи піддавали дії хронічної фторидної інтоксикації. Контрольних тварин 3-ї групи одночасно щоденно піддавали ІГТ та додано їм до їжі олію амаранту в дозі 38 мг/кг упродовж 10 діб. До 4-ї групи ввійшли тварини, яких після 30-денного отруєння натрієм фторидом піддавали ІГТ та додавали їм до їжі олію амаранту в дозі 38 мг/кг упродовж 10 днів. Хронічну фторидну інтоксикацію викликали щоденним пероральним введенням натрію фториду у дозі 10 мг/кг упродовж 30 днів [6]. Тварин декапітували на 31-шу добу від початку експерименту з вираженим флюорозом зубів. ІГТ проводили у барокамері в такому режимі: п'ятиразове піднімання тварин на висоту 3000 м по 10 хв. Перерви між сеансами гіпоксії – 15 хв, тривалість тре-

нування 10 днів. Швидкість “піднімання” – 20 м/с [7].

Принцип методу кількісного визначення вмісту метаболітів і кофакторів окисно-відновних реакцій ґрунтується на відновленні НАД(Ф)Н у відповідних дегідрогеназних реакціях і реєстрації змін оптичної густини реакційного середовища. Контрольна кювета містила ту саму суміш, що і дослідна, за винятком тканинного екстракту, замість якого додавали відповідну кількість буфера. Після визначення вихідної екстинкції проби, реакцію розпочинали додаванням до контрольної і дослідної кювет таку кількість ферменту, яка забезпечувала завершення реакції. Для визначення вмісту лактату використовували реакцію, каталізовану лактатдегідрогеназою (ЛДГ): $\text{лактат} + \text{НАД}^+ \leftrightarrow \text{піруват} + \text{НАДН}$ [8]. В інкубаційному середовищі рівновага реакції зміщена вліво, тому перетворення лактату в піруват проводили в лужному середовищі за наявності гідразину, який зв'язує утворений піруват. Реакційна суміш містила 1,35 мл 200 М гідразинового буфера (рН 9,5); 0,15 мл 50 М розчину НАД; 1,2 мл дистильованої води; 0,3 мл безбілкового екстракту і 0,03 мл розчину ЛДГ (5 мг/мл). Реакцію завершували через 20 хв. Екстинкцію вимірювали при довжині хвилі 340 нм. Для визначення вмісту пірувату використовували ту саму реакцію. Оскільки її рівновага зміщена вліво, то при надлишку НАДН піруват швидко і кількісно перетворюється в лактат [8]. Реакційна суміш містила 1,0 мл 400 М триетаноламінового буфера (рН 7,4); 0,04 мл 5 М розчину НАДН; 2 мл безбілкового екстракту тканини і 0,04 мл розчину ЛДГ (10 мг/мл). Оптичну густину реєстрували при довжині хвилі 340 нм. Матеріалом для електронної мікроскопії була печінка. Зрізи контрастували спочатку в 2%-му розчині уранілу ацетату [9], а після цього – у розчині цитрату свинцю [10]. Вивчення і фотографування матеріалу проводили за допомогою мікроскопа УЕМВ-100К при прискорюючій напрузі 75 кВ і збільшеннях на екрані від 4000 до 19000 разів. Досліди

виконували з дотриманням Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (редакція від 06.11.2023 р.), Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей (22.09.2010 р.) та з погодження комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів ЛНМУ імені Данила Галицького (протокол № 2 від 20.02.2023 р.). Результати вмісту молочної та пірвиноградної кислот опрацьовували статистично з визначенням вірогідності за критерієм t Стьюдента за допомогою програми Microsoft Excel, що входить до пакета Microsoft Office та програмного забезпечення RStudio.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У групі тварин з хронічною фторидною інтоксикацією зафіксовано порушення анаеробного енергетичного обміну, зокрема, вміст основних метаболітів гліколізу лактату та пірувату у крові достовірно відрізнявся від контрольних значень: концентрація лактату була знижена на 26,3%, пірувату – збільшена вдвічі. Таку ситуацію можна пояснити специфічною властивістю фтору, яка полягає у здатності інактивувати ферменти гліколізу: гексокіназу, енолазу, фосфоглюкомутазу, а також сукцинатдегідрогеназу, ферменти системи цитохромів [11]. При фторидній інтоксикації незначне зменшення відносно норми вмісту молочної кислоти і більш значне підвищення відносно контролю вмісту пірвиноградної кислоти, згідно з літера-

турними даними, є наслідком порушення спряженості окисного фосфорилування, переважанням оксигеназних реакцій. Це призводить до мембрано-деструктивних порушень у функціонуючих системах мітохондрій [6]. Тому одним зі шляхів корекції енергодифіциту, який виникає, повинно бути використання екзо- або ендогенних речовин, які беруть участь в енергетичному обміні [12]. Слід відмітити, що застосування олії амаранту та ІГТ сприяло нормалізації у крові концентрації лактату та пірувату (таблиця).

Ультраструктура гепатоцитів та синусоїдальних гемокапілярів за умов фторидної інтоксикації змінена і описана у попередніх наших дослідженнях [13, 14]. Зафіксовано значну електронну щільність гепатоцитів, що вміщують велику кількість пероксисом, аутофаголізосом, вакуолей, мікроміхурців, ліпопротеїнові краплі великих розмірів. Виявлено у значних кількостях мітохондрії з фрагментованими кристами, що може зумовлювати зменшення окисного фосфорилування. Згідно з літературними даними фтор суттєво знижує тканинне дихання у печінці [15]. Виявлені нами морфологічні зміни можуть вказувати на неспецифічне порушення постачання кисню до клітин за умов екстремальних впливів [16].

Також ми вивчали окремо вплив амарантової олії на ультраструктурну організацію тканин печінки і проводили електронно-мікроскопічні дослідження тканин печінки щурів, які споживали додану до їжі олію та одночасно підлягали дії ІГТ [17]. Установлено, що 10-денне споживання олії амаранту

Зміни вмісту молочної та пірвиноградної кислот у крові щурів з хронічною фторидною інтоксикацією за умов застосування інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ) та олії амаранту ($M \pm m$, $n = 10$)

Показники	Контроль	NaF	ІГТ і олія амаранту	NaF, ІГТ і олія амаранту
Лактат	1,70±0,16	1,25 ± 0,07*	1,76 ± 0,13***	1,72 ± 0,14**
Піруват	0,096±0,007	0,192± 0,020*	0,099 ± 0,009***	0,093 ± 0,009**
Лактат/піруват	17,71 ± 1,32	6,51 ± 0,64*	18,1 ± 1,53**	18,4 ± 1,61*

Примітка: *P < 0,05 щодо контролю; **P < 0,05 щодо дії NaF; ***P < 0,05 щодо комплексної дії ІГТ і олії амаранту.

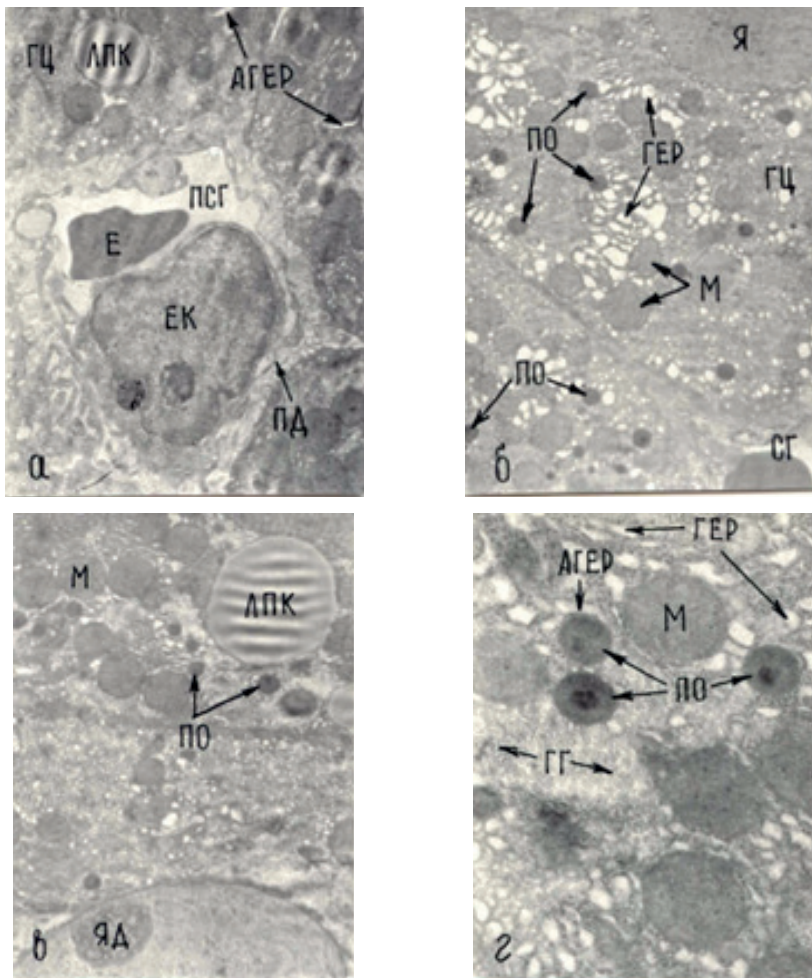
призводило до збільшення кількості рибосом і мітохондрій у присарколемальній зоні. Ці зміни можуть вказувати на індукцію синтезу білка і посилення функціонування системи енергопродукції, що узгоджується з літературними даними, де відмічено позитивний вплив біологічно активних речовин олії амаранту на функцію гепатоцитів і білок-синтезувальну функцію печінки [5]. Електронно-мікроскопічні дані тканин печінки щурів 3-ї групи (олія амаранту і одночасно дія ІГТ) у цитоплазмі гепатоцитів відмітили ефект формування блоків пероксисом, що побудовані з окремих ланцюгів, оточених полями гранул глікогену та віддаленими від них електронно-світлимипо липопро-теїновими краплями. За таких умов мітохондрії знаходяться по периметрах полів гранул глікогену. Розташування пероксисом, гранул глікогену та електронно-світлих липопро-теїнових крапель, на нашу думку, може бути свідченням активації гліоконеогенезу та спрямованим на забезпечення структурно-метаболического тла регенеративних процесів.

У білих щурів з хронічною фторидною інтоксикацією за умов сумісної дії інтервальної гіпоксії та олії амаранту печінкові балки і синусоїдальні гемокапіляри нагадували собою структури інтактних тварин (рисунок). Просвіти синусоїдальних гемокапілярів були розширені та вміщували поодинокі еритроцити. Ендотеліальні клітини стінки синусоїдальних гемокапілярів містили ядра великих розмірів. Простір Діссе при цьому дещо розширений, зі значною кількістю мікроворсинок, які пов'язані з плазматичною мембраною синусоїдального полюса гепатоцитів. У цитоплазмі гепатоцитів зафіксовані липопро-теїнові краплі великих розмірів та розширені канали агранулярного ендоплазматичного ретикулула (див. рисунок, а). Спостерігалися в деяких гепатоцитах розширені канали гранулярного ендоплазматичного ретикулула, комплексу Гольджі (див. рисунок, б).

Білярний полюс цих гепатоцитів, вміщує

також ліпопротейнові краплі, значну кількість мітохондрій та пероксисом (див. рисунок, в). У частини гепатоцитів ділянка цитоплазми, що прилягає до ядра, з дрібнозернистою гіалоплазмою, а самі ядра наповнені еухроматином і ядерцем, в якому розвинені фібрилярні центри, фібрилярні та гранулярні компоненти.

Нами відмічено, що окремі ділянки цитоплазми багаті на гранули глікогену, контактують з мітохондріями, скупченнями пероксисом, до яких впритул прилягають розширені канали агранулярного ендоплазматичного ретикулула (див. рисунок, г). Таке поєднання органел і включень відображає ультраструктурний механізм, спрямований на акумуляцію надлишкових кількостей жирних кислот, що потрапляють із крові в гепатоцити та, можливо, їх подальше залучення в енергетичний обмін в екстремальних умовах і забезпечення структурно-метаболического тла відновних процесів. Це узгоджується з літературними даними, згідно яким у мітохондріях на кристах відбувається фосфорилювання АДФ з утворенням АТФ за допомогою енергії окиснення органічних сполук молекулярним киснем [18]. Просте збільшення кількості мітохондрій посилює здатність клітин і тканин утилізувати кисень із крові і синтезувати АТФ [19]. При гіпоксії може експресуватись фактор 1- α , індукований гіпоксією, який ініціює запуск компенсаторних механізмів вироблення енергії [12]. Можна припустити, що олія амаранту, до складу якої входять ненасичені жирні кислоти, токоферол, сквален, забезпечує структурно-метаболическу основу індукованої короткотривалими експозиціями гіпоксії-реоксигенації активації кисневого метаболізму. Наявний в олії амаранту сквален має здатність залучатися у процеси перенесення, накопичення кисню та його активних форм, на фоні гіпоксії-реоксигенації сприяє підтримці кисневого гомеостазу, який оптимізує ефективне енергозабезпечення [20, 21]. Важливою є його роль як регулятора ліпідного і стероїдного обмінів в



Ультраструктура тканин печінки щурів з хронічною фторидною інтоксикацією за умов застосування інтервального гіпоксичного тренування та олії амаранту: а – просвіт синусоїдального гемокапіляра розширений; гепатоцити, які вміщують агранулярний ендоплазматичний ретикулум. Зб. $\times 4000$; б – гепатоцити із гранулярним ендоплазматичним ретикулумом. Зб. $\times 5000$; в – ліпопротеїнові краплі, оточені мітохондріями, гранулами глікогену та пероксисомами. Зб. $\times 6000$; г – мітохондрії, пероксисоми і скупчення гранул глікогену. Зб. $\times 19000$

організмі. ІГТ та олія амаранту забезпечили високу активність регенераторних процесів у тканинах печінки. Ультраструктурна організація синусоїдальних гемокапілярів, жовчних гемокапілярів та цитоплазми гепатоцитів може вказувати на потужний коригуючий ефект комплексної дії ІГТ та олії амаранту при фторидній інтоксикації. При поєднаному впливі обох чинників зростає ефективність та потужність енергетичного обміну і залучення реакцій ліпопероксидації та їхніх продуктів в оксидазні процеси, що так само оптимізує кисневий гомеостаз в екстремальній ситуації.

ВИСНОВКИ

Підсумовуючи можна відмітити, що одночасне застосування ІГТ та олії амаранту при хронічному впливі фторидів призводить до нормалізації енергетичного обміну і, як наслідок, до повного відновлення структури елементів органів через достатнє посилення внутрішньоклітинної репаративної регенерації. Доведена на основі біохімічних показників та ультраструктурних характеристик висока ефективність поєднаного застосування ІГТ та олії амаранту при пошкодженні структури та

функції органів і клітин обґрунтовує доцільність включення цих чинників у комплексну корекцію обмінних процесів за умов фторидної інтоксикації.

Автори дякують співробітнику лабораторії електронної мікроскопії ЛНМУ імені Данила Галицького к.б.н. В.І. Ковалишину за сприяння у проведенні електронно-мікроскопічних досліджень.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

U.V. Konyk¹, L.P. Kozak²

THE APPLICATION OF INTERMITTENT HYPOXIC TRAINING AND AMARANTH OIL UNDER CHRONIC FLUORIDE INTOXICATION

¹*Bogomolets National Medical University, Kyiv;
e-mail: uvkonyk@gmail.com;*

²*Danylo Halytsky Lviv National Medical University;
e-mail: kozak.l.p.lnmu@gmail.com*

The study of the effect of environmental factors and the possibilities of correcting their influence, especially during war, cannot occur without taking into account changes in the organism's energy metabolism. Recently, intermittent hypoxic training (IHT) has been used extensively for altitude preacclimatization, for the treatment of a variety of clinical disorders, and in sports. Amaranth oil has an antioxidant, membrane-protective effect. Therefore, it is possible to apply it to maintain the structural and functional integrity of cellular and subcellular membranes during fluoride intoxication. The aim of the present study was to evaluate changes in morphologic characteristics of liver tissues and the state of energy metabolism in rats with chronic fluorine intoxication treated by intermittent hypoxic training and with an amaranth oil feeding supplement. Fluorine intoxication was induced by oral administration of sodium fluoride (10 mg/kg) for 30 days. IHT was carried out in a pressure chamber as follows: five 10-min elevations to the "height" of 3000 m were repeated 5 times with 15-minute intervals for 10 days. At the same time, rats were fed amaranth oil in the diet at a daily dose of 38 mg/kg for 10 days. The liver tissue specimens underwent electron microscopy examination. It was found

that both intermittent hypoxic training and amaranth oil contributed to the normalization of energy metabolism and liver ultrastructure under chronic fluoride intoxication. The ultrastructural organization of sinusoidal hemocapillaries, biliary hemocapillaries and the cytoplasm of hepatocytes indicates a powerful corrective effect of both amaranth oil and IHT in fluoride intoxication. The simultaneous application of IHT and amaranth oil with chronic exposure to fluorides leads to the normalization of energy metabolism and, as a result, to the complete restoration of the structure of organ elements due to the sufficient strengthening of intracellular reparative regeneration. The high efficiency of the combined application of IHT and amaranth oil against damage to the structure and function of organs and cells, proven based on biochemical indicators and ultrastructural characteristics, justifies the expediency of including these factors in the complex correction of metabolic processes under fluoride intoxication.

Key words: chronic fluoride intoxication; intermittent hypoxic training; amaranth oil; energy metabolism; liver, ultrastructure.

REFERENCES

1. Rosova KV. Structurally determined mitochondrial response on hypoxia and neurodegeneration. Kyiv: Knowledge of Ukraine; 2019. [Ukrainian].
2. Kozak LP. Peculiarities of ethanol intoxication of animals at application of intermittent hypoxic training at the beginning of alcohol consumption. *Med Sci Ukr.* 2021;17 (2):33-9. [Ukrainian].
3. Santocildes G, Viscor G, Pages T, Ramos-Romero S, Torres JL, Torella JR. Physiological effects of intermittent passive exposure to hypobaric hypoxia and cold in rats. *Front Physiol.* 2021;12: 673095.
4. Pasko P, Barton H, Zagrodzki P, Chlopicka J, Izewska A, Gawlik M, Gorinstein S. Effect of amaranth seeds in diet on oxidative status in plasma and selected tissues of high fructose-fed rats. *Food Chem.* 2011;126:85-90.
5. Harashchuk MI, Stepchenko LM, Spitsina TL, Goryaniy VR. Metabolism state in laboratory rats when using amaranth oil and Humilid. *Theoret Appl Veterinar Med.* 2021; 9(1): 30-4.
6. Akimov OY, Mishchenko AV. The role of AP-1 transcription factors in the change of superoxide production by mitochondria of the rat stomach mucosa under chronic fluoride intoxication. *Proc Ukr Sci Pract Conf "Medical Science – 2021"; 2021 Dec 3; Poltava; 2021. p. 31-2.*
7. Park H-Y, Shin C, Lim K. Intermittent hypoxic training for 6 weeks in 3000 m hypobaric hypoxia conditions enhances exercise economy and aerobic exercise performance in moderately trained swimmers. *Biol Sport.* 2018;35(1):49-56.
8. Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis.* 2nd ed. 1975.
9. Glauert AM. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Practical methods in electron microscopy.* New York: North-Holland (Am Elsevier). 1975.
10. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an

- electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;17: 208-12.
11. Kyzer JL, Martens M. Metabolism and toxicity of fluoride compounds. *Chem Res Toxicol.* 2021;34(3):678-80.
 12. Gunina LM, Belenichev IF, Rosova KV, Ataman YuO, Voitenko VL, Bezugla VV. Energy supply of the heart and skeletal muscles during exercise: mitochondrial vector. *Fiziol Zh.* 2022; 68 (5): 67-78. [Ukrainian].
 13. Konyk UV, Kozak LP. Structural and metabolic changes in rats with chronic fluoride intoxication. *Mod Probl Hyg Epidem Microbiol Tubercul: Proceedings of the scientific and practical conference; 2024 May 22-23; Lviv – Torun; 2024.* p. 52-59. [Ukrainian].
 14. Konyk UV, Kozak LP. Oxidative stress parameters in rats with chronic fluoride intoxication. *Mod Probl Hyg Epidem Microbiol Tubercul.* 2024;1:52-8. [Ukrainian].
 15. Sharma P, Pawan KV, Shilpa S, Maninder S, Deepika V. Impact of chronic sodium fluoride toxicity on antioxidant capacity, biochemical parameters, and histomorphology in cardiac, hepatic, and renal tissues of Wistar rats. *Biol Trace Elem Res.* 2023; 201(1): 229-41.
 16. Tretter V, Zach M-L, Bohme S, Ullrich R, Markstaller K, Klein KU. Investigating disturbances of oxygen homeostasis: From cellular mechanisms to the clinical practice. *Front Physiol.* 2020;1: A 947.
 17. Hzhohotsky MR, Konyk UV, Kozak LP, Kovalyshyn VI. The influence of amaranth oil and intermittent hypoxic training on liver ultrastructural and metabolic changes induced by fluorine intoxication and low doses of ionizing radiation. *Fiziol Zh.* 2006; 52 (3): 90-9. [Ukrainian].
 18. Abate M, Festa A, Falco M, Lombardi A, Luce A, Grimaldi A, Zappavigna S, Sperlongano P, Irace C, Caraglia M, Misso G. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;98:139-53.
 19. Lyabakh KG. Regulation of cell oxygen regime based on free diffusion. *Fiziol Zh.* 2019; 65(3): 12-21. [Ukrainian].
 20. Bang J-H, Lee KJ, Jeong WT, Han S, Jo I-H, Choi S-H, Cho H, Hyun T-K, Sung J, Lee J, So Y-S, Chung J-W. Antioxidant activity and phytochemical content of nine *Amaranthus* species. *Agronomy.* 2021; 11(6):1032.
 21. Park S-J, Sharma A, Lee H-J. A review of recent studies on the antioxidant activities of a third-millennium food: *Amaranthus* spp. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9(12):1236.

*Матеріал надійшов
до редакції 27.06.2024*