

© Коллектив авторов, 2015  
УДК 612.018:616.8-008.615:612.65:599.323.4

*В.В.Хлебников<sup>1, 2</sup>, С.Л.Кузнецов<sup>3</sup>, Д.А.Чернов<sup>3</sup>, А.М.Азрыцков<sup>2</sup>, А.Ахмад<sup>4</sup>,  
М.Н.К.Нор-Ашикин<sup>4</sup>, М.Улла<sup>5</sup>, М.Ю.Капитонова<sup>4</sup>*

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕТЕРОТИПИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

<sup>1</sup> Кафедра внутренних болезней (зав. — доц. Ч.Р.Драман), медицинский факультет, Международный исламский университет Малайзии, г. Куантан; <sup>2</sup> кафедра неврологии (зав. — д-р мед. наук О.В.Курушина), Волгоградский государственный медицинский университет; <sup>3</sup> кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — чл.-кор. РАН проф. С.Л.Кузнецов), Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова; <sup>4</sup> кафедра анатомии медицинского факультета (зав. — проф. М.Ю.Капитонова); <sup>5</sup> кафедра анатомии (зав. — канд. биол. наук Нур Азлиза Вани Абд Азиз), стоматологический факультет, Университет технологии МАРА, г. Шах Алам, Малайзия

Проведено экспериментальное изучение возрастных особенностей адаптации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) к действию гетеротипических стрессоров в контексте стресс-ассоциированных поведенческих реакций. Крыс линии Спрейг-Дули в возрасте 3 (молодые), 6 (половозрелые) и 12 (стареющие) мес, всего 36 животных, подвергали действию меняющихся стрессоров на протяжении 7 сут, после чего производили оценку их поведенческих реакций. Исследовали гистологические изменения в гипоталамусе, гипофизе, надпочечниках в сравнении с возрастным контролем, ставили иммуногистохимические реакции на кортиколиберин (КРФ), аденокортикотропный гормон (АКТГ), ED1, PCNA, каспазу-3 с последующим анализом изображения. В стареющем организме по сравнению с молодыми и половозрелыми животными уровень активации звеньев ГГНС свидетельствовал о диссоциации в ее центральном звене и предотвращении адаптивной десенситизации, характерной для молодых и половозрелых животных. В частности, у стареющих животных отмечена высокая экспрессия КРФ в гипоталамусе при стрессе при сравнительно низкой экспрессии АКТГ в аденогипофизе и высоком уровне активности надпочечников. Уменьшение пластичности ГГНС у стареющих животных по сравнению с другими возрастными группами соответствовало обнаруженным у них поведенческим сдвигам, демонстрируя снижение способности стареющего организма адаптироваться к хроническому действию непредсказуемо меняющихся стрессоров.

**Ключевые слова:** гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, старение, иммуногистохимия, гетеротипический стрессор, хронический стресс

Хронический стресс повышает экспрессию кортиколиберина (КРФ) в гипоталамусе, прежде всего в нейронах мелкоклеточной части его паравентрикулярного ядра (ПВЯ), что вызывает активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) с усилением выработки адренокортикотропного гормона (АКТГ) передней долей гипофиза и может провоцировать развитие тревожно-депрессивных состояний [4, 7, 12]. При этом, происходит нарушение глюкокортикоидной обратной связи, вызванное подавлением экспрессии рецепторов глюкокортикоидов в головном мозгу [10, 15]. В настоящее время активно ведутся поиски эффективных средств нормализации

активности ГГНС, способных предотвратить развитие постстрессовых психоневрологических нарушений [11, 15]. Описаны возрастные особенности адаптационных изменений в ГГНС в экспериментальных моделях гомотипического стресса (с использованием одного стрессора) [1, 13]. В современной экспериментальной медицине получила распространение гетеротипическая модель стресса с меняющимися стрессорами [8, 14], исследования ГГНС в возрастном аспекте с использованием такой модели единичны [5, 7].

Цель настоящей работы — сравнительная морфофункциональная оценка связанных со стрессом изменений в различных звеньях ГГНС у экспери-

### Сведения об авторах

*Хлебников Владимир Витальевич* (e-mail: zorina40@mail.ru), *Азрыцков Алексей Михайлович*, кафедра неврологии, Волгоградский государственный медицинский университет, 400066, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1

*Кузнецов Сергей Львович*, *Чернов Дмитрий Александрович*, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

*Азхар Ахмад*, *Капитонова Марина Юрьевна* (e-mail: marinakapitonova@mail.ru), кафедра анатомии;

*Нор-Ашикин Мохд Нур Кхан* (e-mail: noras@salam.uitm.edu.my), кафедра физиологии, медицинский факультет;

*Музаммил Улла* (e-mail: muzammil@salam.uitm.edu.my), кафедра анатомии, стоматологический факультет; Технологический университет МАРА, 40100, Малайзия, г. Шах Аллам, Селангор, Сунгай Було, Госпитальная улица, Кампус медицинского факультета Университета технологии МАРА, Академический корпус, 7 (Unit 7-7, Block 35, Kemunchak Condominium, Section 9, 40100 Shah Alam, Malaysia)

ментальных животных разных возрастных групп с учетом поведенческих реакций.

**Материал и методы.** Исследование проведено в соответствии с заключением Этического комитета по контролю за использованием экспериментальных животных в научных исследованиях медицинского факультета Университета технологии МАРА от 12 ноября 2008 г. В работе использованы крысы-самцы породы Спрей-Доули молодые (3 мес) и половозрелые (6 мес), а также стареющие (12 мес) — по 12 особей в каждой группе (по 6 в контрольной и экспериментальной подгруппах). Экспериментальных животных подвергали действию гетеротипического непредсказуемого стресса ежедневно по 5 ч в течение 7 сут [8]. Животных содержали в стандартных виварных условиях при температуре  $20 \pm 2$  °C с доступом к воде и пище *ad libitum*. По окончании последнего стрессорного воздействия проводили оценку поведенческих реакций с помощью теста открытого поля, приподнятого крестообразного лабиринта и предпочтения для питья раствора сахарозы, которые позволяют оценивать уровень тревожности, исследовательскую и двигательную активность животных [3]. Общее число пересечений в открытом поле характеризует двигательную активность, а доля пересечений периферических квадратов по отношению к общему числу пересечений определяется как индекс тревожности [6]. После проведения поведенческих тестов анестезированных животных декапитировали; гипоталамус, гипофиз и надпочечники фиксировали формалином и после стандартной обработки заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином — эозином и иммуногистохимически с применением антител к КРФ (Сигма, США) — для гипоталамуса (разведение 1:50), АКТГ (ДАКО, Дания) — для гипофиза (разведение 1:100), каспазы-3 (Сигма, США) — маркер апоптоза (разведение 1:50), PCNA (Серотек, США) — маркер пролиферации (разведение 1:100), ED1 (Серотек, США) — маркер зрелых макрофагов (разведение 1:100) стрептавидин-биотин-пероксидазным методом с визуализацией диаминобензидином в соответствии с рекомендациями производителей реактивов. Для определения удельной площади иммунопозитивных клеток проводили цифровой анализ с использованием анализатора изображений «Лейка 2140» (Leica, Германия) и программы «Leica QWin». Оценку ста-

статической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента.

**Результаты исследования.** Хронический стресс снижал предпочтение раствора сахарозы у экспериментальных животных, причем эта тенденция обнаруживалась во всех возрастных группах с более высоким уровнем значимости у стареющих животных (рис. 1, а). Индекс тревожности имел тенденцию уменьшаться с возрастом и значимо увеличивался по сравнению с контролем при стрессе в исследованных возрастных группах, кроме стареющих животных (см. рис. 1, б). Пребывание в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта у стареющих животных было исходно более низким, чем у крыс других возрастных групп, и уменьшение его после стресса было минимальным по сравнению с таковым в других возрастных группах. Наибольшее снижение данного показателя отмечено у 3- и 6-месячных животных (см. рис. 1, в).

Относительная масса надпочечников снижалась у контрольных животных с возрастом и значимо повышалась у крыс всех возрастных групп после стресса (рис. 2, а). Соотношение коркового и мозгового вещества незначительно возрастало у контрольных крыс с возрастом, а после стресса больше всего увеличивалось у стареющих животных и было максимальным (см. рис. 2, б).

В аденогипофизе у экспериментальных животных всех возрастных групп по сравнению с контролем наблюдались микроциркуляторные нарушения в виде полнокровия капилляров и венул, гиперплазия базофильных эндокриноцитов, увеличение числа фолликулов и кист, наиболее отчетливо выраженное у стареющих особей, у которых также отмечалось незначительное

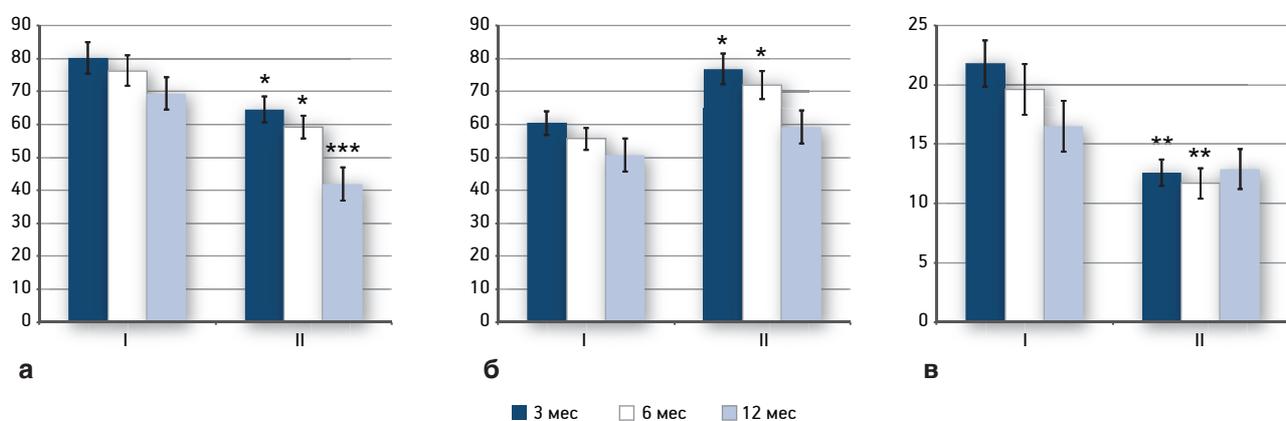


Рис. 1. Показатели степени выраженности поведенческих реакций у молодых, половозрелых и стареющих контрольных крыс и после перенесенного хронического стресса.

а — потребление сахарозы; б — индекс тревожности; в — пребывание в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта. По оси абсцисс: I — контрольные (интактные) животные; II — экспериментальные животные; по осям ординат: а — доля от общего объема выпитой жидкости (%); б — доля от общего числа пересечений периферических квадратов (%); в — время, проведенное в открытых рукавах (с). Различия значимы по сравнению с контролем: \* при  $P < 0,05$ ; \*\* при  $P < 0,01$ ; \*\*\* при  $P < 0,001$ . Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

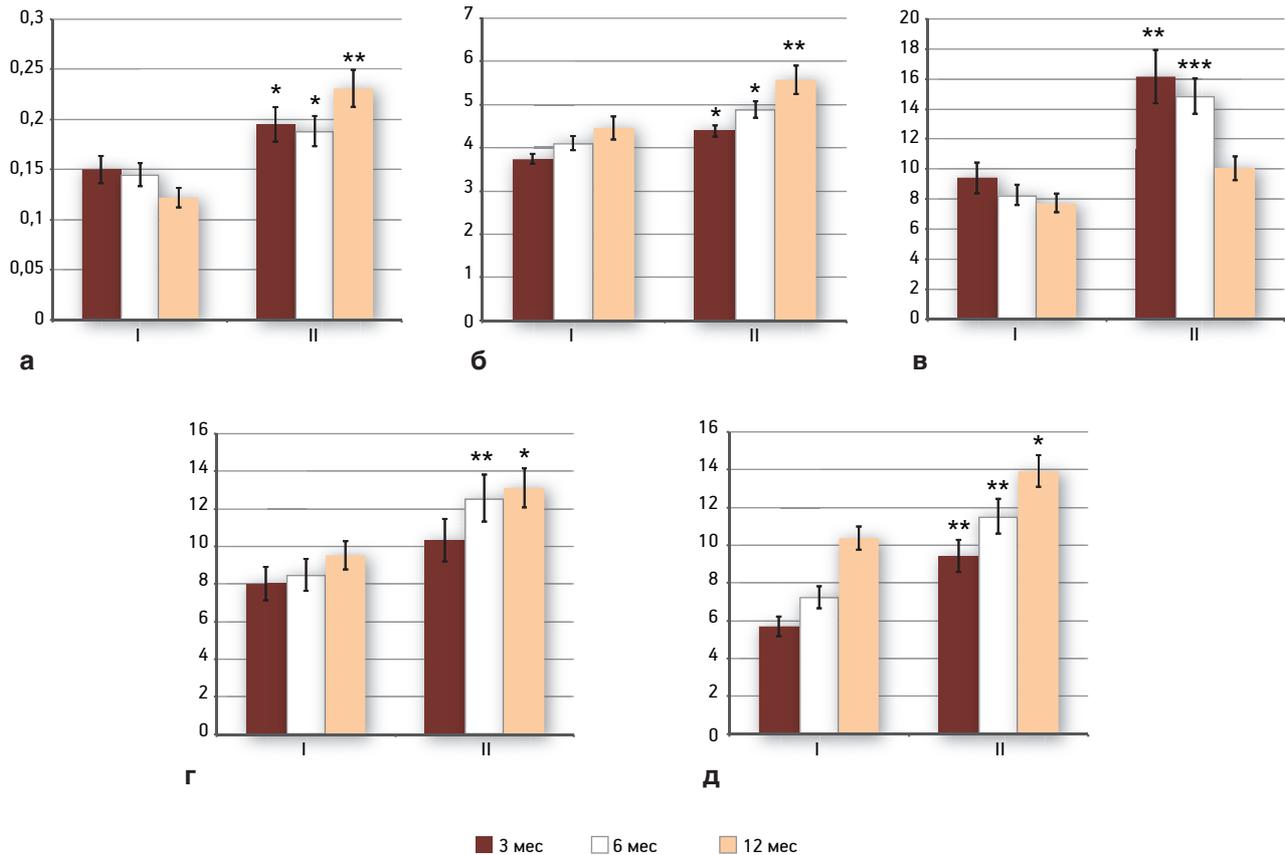


Рис. 2. Морфометрические показатели, характеризующие надпочечники (а, б), аденогипофиз (в, г) и гипоталамус (д) молодых, половозрелых и стареющих контрольных крыс и после перенесенного хронического стресса.

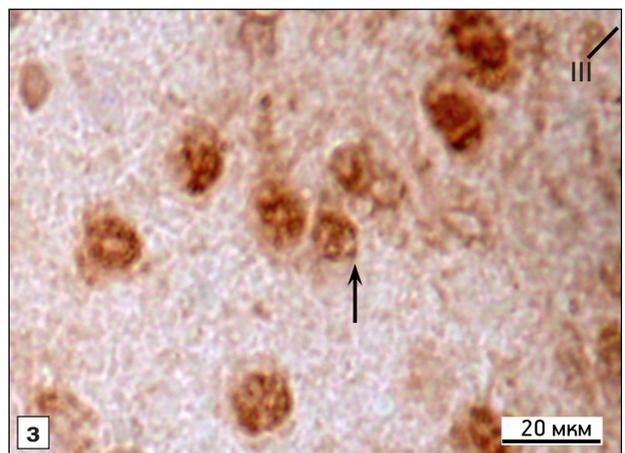
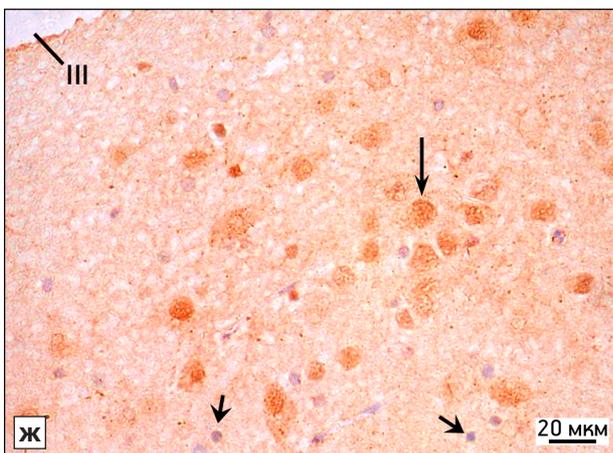
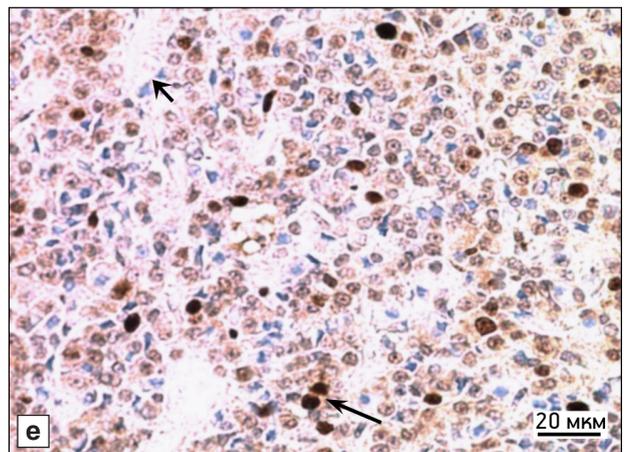
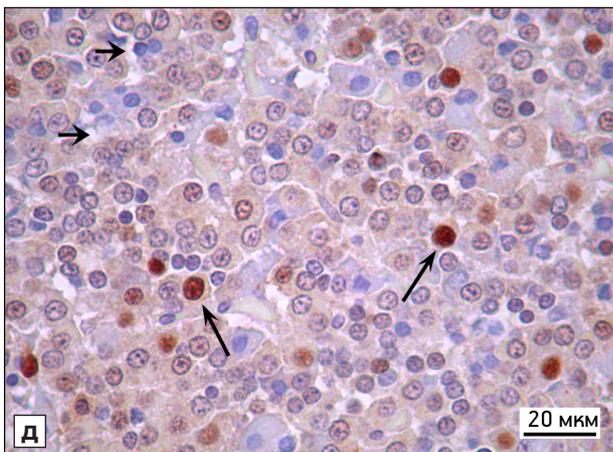
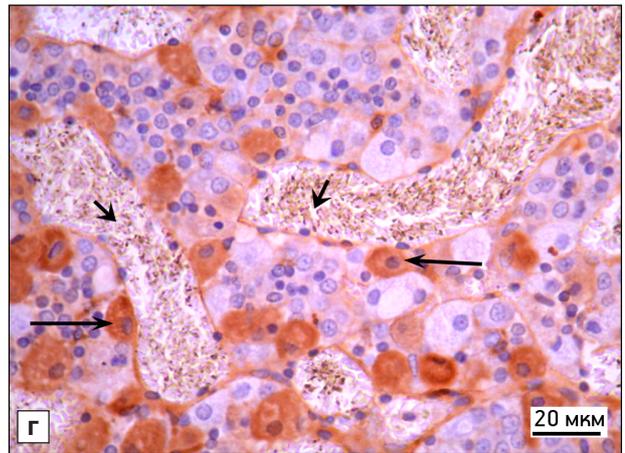
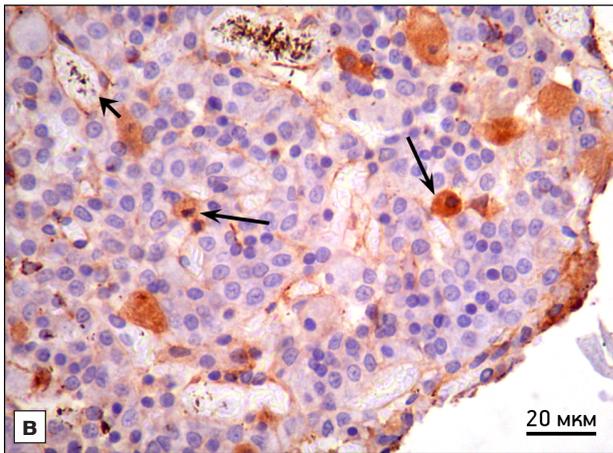
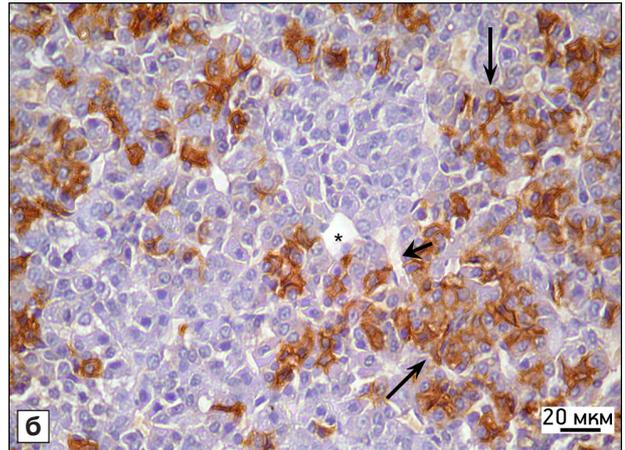
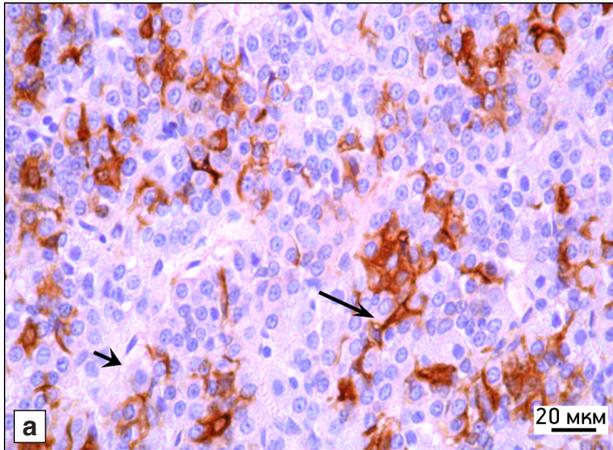
По оси абсцисс: I — контрольные (интактные) животные; II — экспериментальные животные; по осям ординат: а — относительная масса надпочечника (%); б — соотношение коркового и мозгового вещества; в — удельная площадь адренортикопозитивных клеток (%); г — удельная площадь ED1-позитивных клеток (%); д — удельная площадь кортиколиберин-позитивных клеток (%). Различия значимы по сравнению с контролем: \* при  $P < 0,05$ ; \*\* при  $P < 0,01$ ; \*\*\* при  $P < 0,001$ . Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

увеличение доли АКТГ-иммунопозитивных клеток, в то время как у молодых и половозрелых животных она значимо возрастала (см. рис. 2, в; 3, а, б). Реакция на ED1 выявила неожиданно много крупных иммунопозитивных клеток в аденогипофизе с тенденцией к некоторому увеличению их числа с возрастом. После хронического стресса удельная площадь этих клеток значимо повышалась только у половозрелых и стареющих животных (см. рис. 2, г; 3, в, г). Количество PCNA-иммунопозитивных клеток после стресса имело тенденцию к повышению во всех возрастных группах (см. рис. 3, д, е).

Стресс вызывал гипертрофию нейронов мелкоклеточной части ПВЯ. Удельная площадь КРФ-иммунопозитивных клеток в ПВЯ имела тенденцию к увеличению с возрастом, достигая максимальных значений у стареющих крыс; однако именно у последних нарастание данного показателя при стрессе было меньшим по сравнению с таковым в других возрастных группах (см. рис. 2, г; 3, ж, з).

**Обсуждение полученных данных.** Организм современного человека в большей степени подвержен влиянию постоянно меняющихся (гетеротипических) стрессоров, закономерности активации ГГНС при которых значительно отличаются от привычных гомотипических моделей стресса с их закономерностями адаптации [13, 14]. Ранее нами были продемонстрированы особенности адаптации ГГНС у животных разных возрастных групп к хроническому гомотипическому стрессу, которые, как показало настоящее исследование, существенно отличаются от таковых при гетеротипическом стрессе у молодых и зрелых, но не у стареющих особей [2], что демонстрирует возрастные изменения пластичности ГГНС.

Поведенческие реакции оценивались нами с применением наиболее информативных и чувствительных критериев тревожных и депрессивных состояний [3]. Снижение предпочтения для питья раствора сахарозы расценивается как ангедония — показатель депрессивного состояния экспериментальных животных. Сокращение пре-



бывания в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта является одним из самых достоверных критериев тревожного состояния. Полученные нами данные оценки поведенческих реакций показали, что у животных разных возрастных групп имели место различные проявления поведенческого дефицита при хроническом стрессе. В целом, у молодых и половозрелых животных отмечались изменения поведения, свидетельствующие о повышении уровня тревожности, в то время как у стареющих крыс преобладали изменения поведения, соответствующие депрессивноподобному состоянию.

Полученные нами данные согласуются с наблюдениями других авторов [12], что и у животных с развившимся после стресса тревожным синдромом и у особей с депрессивными изменениями поведения отмечается повышение экспрессии КРФ в мелкоклеточной фракции ПВЯ гипоталамуса; выявленные нами при этом возрастные закономерности соотношения поведенческого дефицита и содержания КРФ позволяют определить снижение пластичности ГНС при гетеротипическом стрессе с возрастом. Вместе с тем, несмотря на нарушение отрицательной обратной связи и диссоциации ГНС в ее центральном звене, изменений, соответствующих посттравматическому синдрому с гипокортицизмом и атрофией коры надпочечников, отмеченных другими исследователями при хроническом стрессе, в том числе у старых животных [4, 13], в данной возрастной группе не наблюдается. Таким образом, особенности поведенческого дефицита у стареющих животных на фоне снижения пластичности ГНС показывают связь последнего с закономерностями формирования стресс-индуцированной неврологической патологии [9].

Наше исследование продемонстрировало четкую стресс-модулированную, опосредованную возрастом динамику ED1-иммунореактивных клеток в аденогипофизе. Ранее нами была показана стресс-ассоциированная динамика другой макрофагальной клеточной популяции в аденогипофизе — фолликулозвездчатых клеток [2], которая

имела сходную динамику у стареющих животных, и противонаправленную — в других возрастных группах, что подчеркивает их полифункциональность, играющую важную роль в пластичности ГНС.

В нашем иммуногистохимическом исследовании использована количественная оценка КРФ-иммунопозитивных нейронов в мелкоклеточной части ПВЯ гипоталамуса. Данный показатель является чрезвычайно важным для оценки функционального состояния ГНС, так как дает возможность судить об эффективности отрицательной обратной связи, для чего необходимо сопоставление данного показателя с индексами активации других звеньев ГНС.

Как и в работах с определением уровня АКТГ и кортикостерона в крови, в результате наших исследований содержания гормонов в тканях было выявлено, что именно у стареющих животных показатели активации ГНС отличаются высокой вариабельностью. Это позволяет учитывать полученные данные при оценке индивидуальных особенностей нейроэндокринного старения организма [1, 13]. Таким образом, предпринятое исследование, проведенное с применением разнообразных тестов активации ГНС при хроническом гетеротипическом стрессе (поведенческих, морфологических, иммуногистохимических) позволило выявить закономерности адаптационных изменений на разных уровнях ГНС в возрастном аспекте.

Итак, хронический гетеротипический стресс индуцирует изменение диапазона фенотипически определенных адаптационных сдвигов в ГНС, определяемое исходным возрастом экспериментальных животных и отражающееся в модификации поведенческой активности с формированием поведенческого дефицита в виде тревожных состояний у молодых и половозрелых животных и депрессивноподобного поведения в стареющем организме.

Уровень экспрессии КРФ в ПВЯ гипоталамуса и ее связь с ответом периферического звена ГНС характеризуют пластичность центрального звена ГНС, которая определяется возрастом экс-

Рис. 3. Аденогипофиз и гипоталамус 3-месячных (а, б, д—з) и 6-месячных (в, г) контрольных крыс (а, в, д, ж) и крыс после перенесенного хронического стресса (б, г, е, з).

а — иммунопозитивные клетки отростчатой формы, собранные в группы или цепочки (длинная стрелка), синусоиды (короткая стрелка); б — гиперплазия кортикотропных эндокриноцитов, собранных в крупные конгломераты (длинные стрелки), синусоиды (короткая стрелка) расширены, фолликулы (звездочка); в — крупные ярко окрашенные иммунопозитивные клетки с мелкими темными ядрами (длинные стрелки), расположенные в основном вблизи синусоидов (короткая стрелка) или мелких кист; г — множество ярко окрашенных иммунопозитивных клеток (длинные стрелки) в основном около расширенных синусоидов (короткие стрелки); д — иммунопозитивные клетки единичны (длинные стрелки), синусоиды (короткие стрелки); е — иммунореактивные клетки образуют группы (длинная стрелка) и цепочки, расширенные синусоиды (короткая стрелка); ж — скопление иммунопозитивных нейронов мелкоклеточной фракции паравентрикулярного ядра (ПВЯ) со средней интенсивностью окраски (длинная стрелка), ядра глиоцитов (короткие стрелки); з — скопление ярко окрашенных иммунопозитивных нейронов (стрелка) мелкоклеточной фракции ПВЯ (стрелка); III — III желудочек. Иммуногистохимические реакции: а, б — на аденокортикотропный гормон; в, г — на ED1; д, е — на PCNA; ж, з — на кортиколиберин

периментальных животных и влияет на поведенческую активность.

В стареющем организме пластичность гипоталамического звена ГГНС значительно снижается, что подтверждается высокой экспрессией КРФ в гипоталамусе при стрессе на фоне сравнительно низкой экспрессии АКТИГ в аденогипофизе и высокого уровня активности коры надпочечников, что свидетельствует о диссоциации ГГНС в ее центральном звене и предотвращении ее адаптивной десенситизации, характерной для молодых и половозрелых животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гончарова Н.Д., Шмалий А.В., Маренин В.Ю., Смелкова С.А. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система и ферменты глутатионзависимой антиоксидантной системы при старении и стрессе // Бюл. экспер. биол. 2007. Т. 144, № 7. С. 574–577.
2. Капитонова М.Ю., Улла М., Кузнецов С.Л. и др. Возрастная морфофункциональная характеристика фолликулозвездчатых клеток гипофиза крыс при стрессе // Вестн. РАМН, 2013. Т. 11. С. 98–103.
3. Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г. Определение уровня тревожности у крыс: расхождение результатов в тестах «открытое поле», «крестообразный лабиринт» и тесте Фогеля // Бюл. экспер. биол. 2013. Т. 155, № 3. С. 268–270.
4. Шалапина В.Г., Ракицкая В.В., Петрова Е.И. Роль кортикотропин-рилизинг гормона в нарушениях поведения после неизбежного стресса у активных и пассивных крыс // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П.Павлова. 2005. № 2. С. 241–246.
5. Armario A., Escorihuela R.M., Nadal R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals // *Neurosci. Behav. Rev.* 2008. Vol. 32. P. 1121–1135.
6. Avital A., Ram E., Maayan R. et al. Effects of early-life stress on behavior and neurosteroid levels in the rat hypothalamus and entorhinal cortex // *Brain Res. Bull.* 2006. Vol. 68. P. 419–424.
7. Booij S.H., Bouma E.M., de Jonge P. et al. Chronicity of depressive problems and the cortisol response to psychosocial stress in adolescents: the TRAILS study // *Psychoneuroendocrinology.* 2013. Vol. 38, № 5. P. 659–666.
8. Choudhury B.K., Shi X.Z., Sarna S.K. Norepinephrine mediates the transcriptional effects of heterotypic chronic stress on colonic motor function // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009. Vol. 296, № 6. P. 1238–1247.
9. Dageyte G., Van der Zee E.A., Postema F. et al. Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus // *Neuroscience.* 2009. Vol. 162, № 4. P. 904–913.
10. Gądek-Michalska A., Spyrczka J., Rachwalska P. et al. Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity // *Pharmacol. Rep.* 2013. Vol. 65, № 5. P. 1163–1175.
11. Martocchia A., Stefanelli M., Falaschi G.M. et al. Targets of anti-glucocorticoid therapy for stress-related diseases // *Recent. Pat. CNS Drug. Discov.* 2013. Vol. 8, № 1. P. 79–87.
12. Mironova V., Rybnikova E., Pivina S. Effect of inescapable stress in rodent models of depression and posttraumatic stress disorder on CRH and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus // *Acta Physiol. Hung.* 2013. Vol. 100, № 4. P. 395–410.
13. Segar T.M., Kasckow J.W., Welge J.A., Herman J.P. Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strains // *Physiol. Behav.* 2009. Vol. 96, № 1. P. 6–11.
14. Solomon M.B., Jones K., Packard B.A., Herman J.P. The medial amygdala modulates body weight but not neuroendocrine responses to chronic stress // *J. Neuroendocrinol.* 2010. Vol. 22, № 1. P. 13–23.
15. Zalachoras I., Houtman R., Atucha E. et al. Differential targeting of brain stress circuits with a selective glucocorticoid receptor modulator // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. Vol. 110, № 19. P. 7910–7915.

Поступила в редакцию 05.05.2014  
Получена после доработки 10.11.2014

#### AGE-RELATED PECULIARITIES OF THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSEO-ADRENAL SYSTEM IN CHRONIC HETEROTYPIC STRESS

V.V.Khlebnikov<sup>1,2</sup>, S.L.Kuznetsov<sup>3</sup>, D.A.Chernov<sup>3</sup>, A.M.Agryskov<sup>2</sup>, A.Ahmad<sup>4</sup>, M.N.K.Nor-Ashikin<sup>4</sup>, M.Ullah<sup>5</sup>, M.Yu.Kapitonova<sup>4</sup>

Age-related peculiarities of the adaptation of the hypothalamo-hypophyseo-adrenal system (HHAS) to the effect of heterotypic stress was studied experimentally in the context of stress-associated behavioral reactions. Young (3 month old), mature (6 month old) and aging (12 month old) Sprague Dawley rats (total number of animals equal to 36) were exposed to chronic heterotypic stressors for 7 days with the subsequent testing of their behavioral responses. Histological changes were studied in the hypothalamus, pituitary and adrenal glands as compared to age-matched control; immunohistochemical reactions were performed to demonstrate CRF, ACTH, ED1, PCNA and caspase-3 with subsequent image analysis. In the aging organism, as compared to young and mature animals, the degree of HHAS activation indicated the dissociation in its central part and adaptive desensitization prevention, typical to young and mature animals. Specifically, in the aging animals exposed to stress, high hypothalamic CRF expression was noted in association with relatively low hypophyseal ACTH expression and high level of adrenal activity. Reduced HHAS plasticity in the aging animals as compared to that in the other age groups, corresponded to their behavioral changes, demonstrating the reduced capacity of the aging organism to adapt to the exposure of unpredictably changing stressors

**Key words:** *hypothalamo-hypophyseo-adrenal system, aging, immunohistochemistry, heterotypic stressor, chronic stress*

<sup>1</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, International Islamic University Malaysia, Kuantan; <sup>2</sup> Department of Neurology, Volgograd State Medical University, Russia; <sup>3</sup> Department of Histology, Embryology and Cytology, I.M.Sechenov First Moscow State Medical University; <sup>4</sup> Anatomy Unit, Faculty of Medicine, <sup>5</sup> Anatomy Unit, Faculty of Dentistry, International Technological University UiTM (MARA), Shah Alam, Malaysia