

## BORAKS KULLANIMINA BAĞLI KAN-TESTİS BARIYERİNDE GÖRÜLEN DEĞİŞİKLİKLERİN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE CHANGES IN THE BLOOD-TESTIS BARRIER FOR BORAKS USE

Murat TOSUN<sup>1</sup>, Tuğçe ALADAĞ<sup>2</sup>, Esra GÖKALP<sup>2</sup>, Gökçen GÖKÇE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Öğrencisi

### ÖZ

**AMAÇ:** Günlük yaşantıda yaygın olarak kullanılan bor bileşiklerinin uzun süreli kullanımında değişik organlarda doza bağımlı toksik etki olabileceği yönünde bulgular mevcuttur. Bu amaçla çalışmamızda değişik dozlarda boraks kullanılan ratların testislerinde kan-testis bariyeri yapısında ve leydig hücre sayısında görülebilecek değişimi belirlemeyi amaçladık.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Çalışmada her grupta 6'şar erkek rat bulunan toplam 4 grup oluşturuldu. Her gruptaki ratlara boraksın farklı dozları oral yoldan uygulandı. Deney sonrası alınan sol testisler histolojik olarak takip edilerek immunohistokimyasal olarak Claudin-1, Pan Cadherin ve Calretinin ile boyandı ve ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

**BULGULAR:** Testis örneklerinde Cadherin ekspresyonunun artan doza bağımlı azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte Claudin 1 ekspresyonunun gruplar arasında çok değişiklik göstermediği gözlemlendi. Leydig hücre sayısının ise bir kez LD50x2 doz boraks uygulanan ratlarda azalma gösterdiği gözlemlendi.

**SONUÇ:** Elde edilen bulgular boraks kullanımının doza bağımlı olarak testislerde kan-testis bariyeri bileşenleri üzerine zararlı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bu etkiler uzun dönemde infertilite sorunlarına neden olabileceğine sahiptir. Bu nedenle bilhassa bor bileşenleri üretim merkezleri çevresinde olmak üzere çevre kirliliği yönünden önemli korunma tedbirleri alınmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Boraks, İnfertilite, Kan-Testis bariyeri, Claudin, Leydig hücresi

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** The long-term use of boron compounds commonly used in daily life has some dose-dependent toxic effects on different organs. For this purpose, in our study, we aimed to determine the change in blood-testis barrier structure and the number of leydig cells in the testis of rats in which were given borax at different doses.

**MATERIAL AND METHODS:** In our study, 4 groups, in each have 6 male rats were made. Different doses of borax were given orally to rats in each groups. After the experiment, the left testis was excised, histologically processed and stained with Claudin-1, Pan cadherin and Calretinin immunohistochemically and evaluated under light microscopy.

**RESULTS:** In testis slides, it was determined that Cadherin expression decreased parallel to borax doses. However, it was observed that the expression of Claudin 1 did not change much between the groups. The number of Leydig cells was observed to decrease in rats administered once with an LD50x2 dose.

**CONCLUSIONS:** The findings suggest that the use of borax may be deleterious to the blood-testis barrier components in the testes. These effects have the potential to cause long term infertility problems. For this reason, we consider that it is necessary to take important preventive measures in terms of environmental pollution, especially around boron components production centers.

**KEYWORDS:** Borax, Infertility, Blood-Testis Barrier, Claudin, Leydig cell

## GİRİŞ

Bor yaşam için gerekli elementlerden bir tanesi olup dünya üzerinde toplam rezervin %72'si ülkemizde bulunmaktadır. Ülkemizde en yaygın olarak Kütahya, Balıkesir ve Eskişehirde üretilmektedir(1). Genelde taş, kömür ve denizlerde yaygın bulunan bor atmosfere yangınlar, volkan patlamaları ve günlük kullanımları sonucu yayılır (2,3). Bununla birlikte doğada bor saf olarak hemen hiç bulunmaz (4). Günlük yaşantıda daha çok borik asit veya boraks formunda kullanılan bor endüstriyel alanda öncelikle fiberglass üretiminde, gözlük camı yapımında, seramik işlerinde kullanılmaktadır. Borik asit günlük yaşantıda antiseptik, antifungal ve hatta antiviral özelliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer yandan boraks suda erime özelliğine sahip olup deterjan, kozmetik ve edüstriyel ürünlerde sertleştirici olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte bilhassa insektisid olarak etkin bir şekilde karınca, pire ve hamam böceğinden korunmada kullanılması önemlidir (5,6). Her ne kadar insektisid olarak çok etkin toksik etkilere sahip olsalarda memelilerde hemen hiç bilinen akut toksisitesinin olmaması bor bileşiklerinin kullanımında önemli bir avantajdır. Boron eser bir element olmasına karşın normal gelişim ve büyüme için gerekli faktörlerden bir tanesidir. Artrit ve osteoporozda tedaviye yardımcı etkisi yanında insan vücudunda kalsiyum ve magnezyum metabolizmasında faydalı etkileri olduğu bilinmektedir(7,8). Tedaviden öte vücuda günlük belli bir miktarda bor alımı gereklidir. Amerika'da 1999 yılında yapılan bir çalışmada günlük bor ihtiyacının 1 mg olduğu gösterilmiştir (9) Bor vücuda öncelikle elma, portakal, kırmızı üzüm, kivi, avokado, fındık, domates, mercimek zeytin soğan ve patates gibi gıdaların tüketilmesiyle düşük dozlarda olsa da alınmaktadır. Yetmezliği ile ilgili herhangi bir güvenilir veri olmamasına karşın kalsiyum, magnezyum metabolizma bozukluğuna neden olabildiği gözlenmiştir. Ayrıca testosteron ve östrojen kullanımı olumlu yönde etkilemekte olduğu ve embriyolojik gelişimde gerekli olduğu yönünde çalışmalar halen devam etmektedir (10). Deneysel çalışmalarda kanser tedavisinde nötron yakalayıcı olarak kullanıldığı, hücre zarını koruyucu etki yaptığı pıhtılaşmaya karşı koruyucu

etkisi olduğu belirlenmiştir(11). Bununla birlikte yapılan halk sağlığı çalışmaları gibi geniş ölçekli araştırmalarda bor bileşiklerinin üretildiği fabrikaların çevresinde yaşayan insan popülasyonlarında infertilite oranlarının diğer popülasyonlara göre azda olsa fazla olduğu belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan çok sayıda çalışmada kesin bir bulgu tespit edilememekle birlikte genital sistem üzerine olumsuz etkileri olabileceği gözönünde bulundurulmaktadır(12,13).

Kan testis bariyeri, testislerde bulunan seminifer tübüllerin yapısındaki Sertoli hücreleri ile farklı tip spermatogonial seri hücreleri arasında mevcut olan ve spermatogonial seri hücrelerinin immun sistem ile temasını engelleyen özelleşmiş yapılardır. Bu bariyerin yapısında bulunan sıkı bağlantı bölgeleri bu bariyerin ana yapısını oluşturur. Bu sıkı bağlantı bölgelerinde bulunan Claudin 1 ve Cadherin bariyerin esas bileşenlerini oluştururlar. Metabolik, iskemik, immunolojik veya travmatik etkenlere bağlı olarak bu bariyerde oluşabilecek olası hasarlar infertiliteye neden olabilme özelliğine sahiptir. Dolayısıyla vücudun değişik bölgelerinden de bulunan bu bariyerlerden biri olan kan-testis bariyerinin bütünlüğünün korunması gereklidir (14).

Testislerde interstisyel mesafede yer alan Leydig hücreleri testosteron salgısından sorumludur ve seminifer tübüller arasında yaygın olarak bulunurlar. Hücre yüzeylerinde bulundukları Calretinin reseptörleri immunohistokimyasal olarak işaretleme amacıyla kullanılmaktadır (15). Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda farklı dozlarda boraks alımında fare testislerinde kan testis bariyeri yapısında görülebilecek olası histopatolojik değişiklikleri moleküler düzeyde araştırmayı amaçladık.

## MATERIAL AND METHODS

**1. Etik Kurul:** Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik kurulundan onay alındıktan sonra çalışmaya başlandı (25/04/2018/62-Referans No:5018) .

**2. Hayvanlar ve Deneğin Yapılışı:** Çalışmada kullanılan ratlar Deneysel Hayvanları merkezinde deney süresince  $21 \pm 1$  °C sıcaklık ve % 45–55

nem olan ortamda 12/12 saat ışık siklusu göz önünde bulundurulacak şekilde polikarbonat kaplarda saklanıp beslendi. Deney sürecinde her biri ortalama 250-300 gm ağırlığında olan Wistar Albino cinsi toplam 24 adet erkek rat kullanıldı. Bu özelliklere sahip ratlar rastgele seçimle her birinde 6 rat olan 4 ayrı gruba ayrıldı. Grup:1. Kontrol olarak belirlendi ve bu gruptaki ratlara deney süresi olan 21 gün sürede günlük normal gıda yanında sadece 1 cc su gavajla verildi. Grup:2 ise Boraksın LD50 dozu'nun (5 mg/kg) verildiği grup olarak belirlendi ve bu gruptaki ratlara 21 gün süreyle günlük normal gıda yanında sadece 1 cc su içinde eritilmiş boraks'ın LD50 dozu gavajla verildi. Grup:3 Boraksın LD50 dozu'nun 1/5'inin (1 mg/kg) verildiği grup olarak belirlendi ve bu gruptaki ratlara 21 gün süreyle günlük normal gıda yanında sadece 1 cc su içinde eritilmiş boraks'ın LD50 dozunun 1/5'i gavajla verildi. Grup:4'te ise ratlara çalışmanın başlangıcından, son günü olan 21. güne dek sadece normal gıda verilirken 21. günde LD50 dozunun 2 katı 1 cc suda eritilerek bir kezde gavajla oral olarak verildi. 12 saat sonra anestezisi altında dekapitasyon ile sakrifiye edilen ratların sol testisleri çıkartıldı ve fiksatifin doku içine daha iyi geçişi için 4 kutbundan insülin enjektörü ile delindi ve Bouin solüsyonuna fiksasyon için konuldu.

**3. İmmunohistokimya:** Alınan testisler Bouin solüsyonunda 5 gün fikse edildikten sonra otomatik doku cihazında rutin histolojik takip metoduyla takip edilerek parafin bloklara gömüldüler. Bu bloklardan 5 µ kalınlıkta kesitler poli-l-lizini lamlar üzerine alınarak immunohistokimyasal olarak Pan-Cadherin, Claudin-1 ve Calretinin primer antikoru ile boyandılar. İmmunohistokimyasal boyamada öncelikle lamlar üzerine alınan kesitler deparafinize edildikten sonra önce rehidrate edildi ve sonra Sitrata buffer tamponu ile mikrodalga fırında 25 dakika süreyle 80 watt'da kaynatılıp soğutuldu. Dokulardaki peroksidaz aktivitesini yok etmek için %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Methanol karışımında bekletilen kesitlere Sekonder HRP/AEC kit içinde yer alan Protein block damlatılıp zemin boyanması engellendikten sonra primer antikoru olan Pan-Cadherin, Claudin-1 (Thermovision) ve Calretinin (abcam) damlatıldı ve buzdolabında +4 oC'de bir gece

inkübe edildi. Ertesi gün Sekonder HRP/AEC kit içindeki Conjugate'da 30 dakika bekletilen kesitler sonrasında AEC ile boyanarak ışık mikroskop altında ekspresyon takibi yapıldı. Zıt boyama için Mayers Hematoksilen (Labvision) ile boyanan kesitler su bazlı kapatma solüsyonu ile kapatıldı ve ışık mikroskobu altında incelenip değerlendirildi.

**4. Görüntü Analizi:** Işık mikroskobu altında yapılan değerlendirmede Pan-Cadherin ekspresyonu bazal membrana oturmuş spermatogonialarda yer alan hücrelerde değerlendirilirken; Claudin-1 ekspresyonu tübüllerin orta kısmına doğru olan bölgede belirgin şekilde dikkati çekiyordu. Ancak bu bölgelerin bir kısmında hücre sayısının sağlıklı hücre sayımı yapamayacak kadar yoğun immunopozitivite göstermesi nedeniyle hücre sayımı yerine gözlemci bağımlı immunopozitivite belirlenmesi metodu kullanıldı. Diğer yandan Calretinin boyamasında Leydig hücre sayıları Nikon NIS Elements 4.2 Image Analysis Software ile sayıldı. Sayım sırasında birbirinden farklı x20 objektif büyütme altındaki 6 alanda mevcut Leydig hücresi sayıldı ve değerler arası farklılıklar istatistiksel olarak belirlendi.

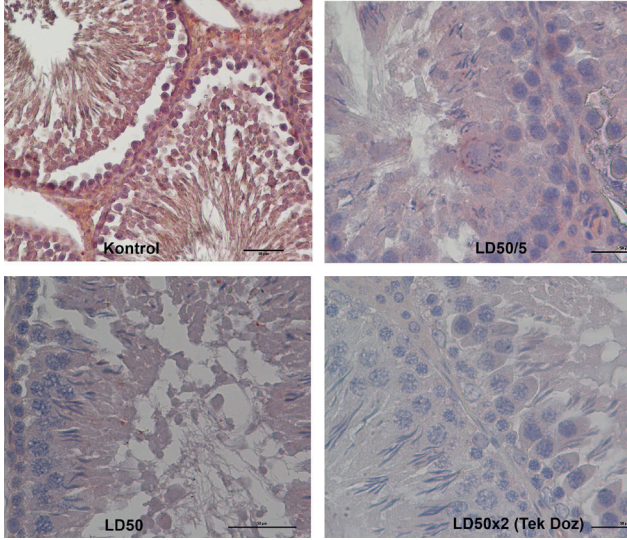
**5. İstatistiksel Analiz:** Calretinin boyaması ile elde edilen değerler SPSS for Windows (23.0) Ticari İstatistiksel Analiz Programı ile analiz edildi. Analiz sırasında gruplar arasındaki değer farklılıklarını belirlemek için One Way ANOVA metodu kullanıldı. P<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Yapılan ışık mikroskobik incelemelerde spermatogoniaların bazal membrana ve tübülün alt kısımlarında Sertoli hücrelerine tutunmasını sağlayarak kan-testis bariyerine destek sağlayan Cadherin ekspresyonunun (**Resim 1**) boraks verilen gruplarda belirgin derecede azaldığı tespit edildi. Kan-Testis bariyerinin esas ögesi olan sıkı bağlantı bölgelerinin yapısında bulunan Claudin-1 ekspresyonunun (**Resim 2**) semifer tübüllerdeki tüm gruplardaki hücreler arasında belirgin bir değişiklik göstermediği gözlemlendi. Leydig hücre sayımında ise Kontrol grubundaki değerler ile LD50/5 ve LD50 grupları arasındaki değerlerde doza

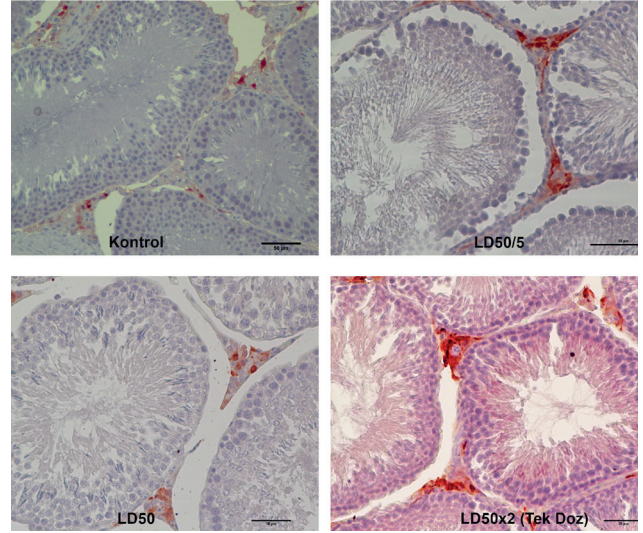


## Pan-Cadherin



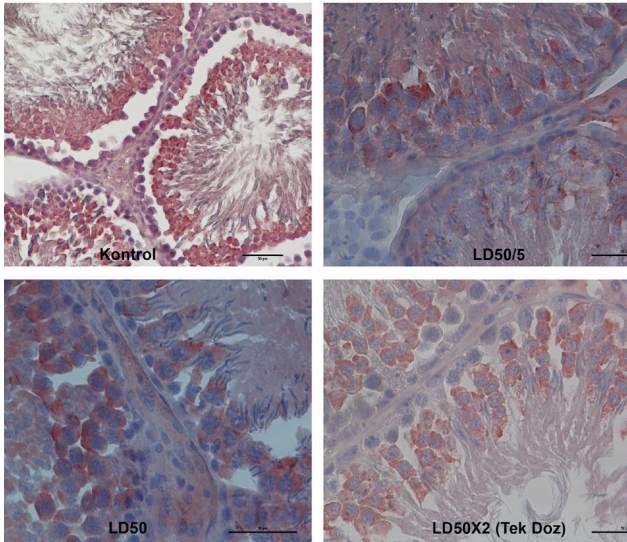
**Resim 1:** Farklı doz boraks uygulanan gruplarda Cadherin ifadesi. (Cadherin primer antikor, Labvision).

## Calretinin



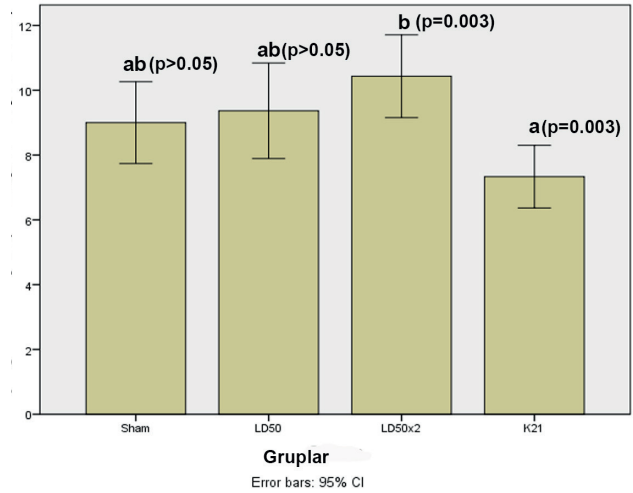
**Resim 3:** Farklı doz boraks uygulanan gruplarda Leydig hücrelerinin görünümü. (Calretinin primer antikor, Abcam).

## Claudin-1



**Resim 2:** Farklı doz boraks uygulanan gruplarda Claudin 1 ifadesi. (Claudin 1 primer antikor, Labvision).

bağımlı artış olmasına karşın buradaki değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ). Diğer yandan 21 gün boyunca normal beslenen ama son günde tek doz LD50x2 gruptaki Calretinin ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmiş Leydig hücre sayısının belirgin şekilde azaldığı ve LD50 doz verilen ratlardaki değerler ile bu grup arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma olduğu tespit edildi ( $p=0.003$ ) (**Resim 3 ve Şekil 1**). Diğer yandan diğer gruplar ile bu grup arasında değerlerde azalma olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 1:** Farklı doz boraks uygulanan ratlarda gruplar arasında Leydig hücre sayısında görülen değişim

## TARTIŞMA

Boraks çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan ve insanlar için esansiyel olan bir elementtir. Günlük yaşantıda oldukça düşük dozlarda vücuda alımı şart olup değişik kimyasal bileşik formları olan boraks ve borik asit şeklinde dünya üzerinde bulunmaktadır. Endüstriyel alanlarda ve sağlık alanında yaygın kullanım alanı olan boraks ve borik asit'e ait kesin anlamda toksikolojik veriler bulunmamakla birlikte bilhassa yüksek dozlarda toksik etkileri olabileceği yönünde önemli bulgular mevcuttur. Kullanıldığı süreçte yerine göre tedavi edici etkinliği mevcut olan esansiyel bir elementin, yerine göre toksik potansiyelinin

olması bu elementin kullanımında çok dikkat edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Boraks toksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda değişik çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Son dönemlerde yapılan bir çalışmada bor'un yüksek dozda kullanımında buğday genotoksiste riskinin çok arttığı ortaya konmuştur (16). Diğer yandan değişik dozlarda içme suyuna uygulandığında bor'un timik sitokin ifadesi, hormon salgısı, antioksidan fonksiyon, hücre çoğalması ve apoptozis üzerine U şekilli doz-etki eğrisi oluşturduğu ortaya konmuştur (17). Yapılan bir hücre kültürü çalışmasında Hep G2 hücre hattına değişik dozlarda bor uygulandığında p53 ve Bax aracılı apoptozis olduğu ortaya konmuştur (18). Testisler üzerine bor bileşiklerinin yaptığı yan etkilerin incelendiği çalışmalardan bir tanesinde borik asitin yüksek dozda alımında yani doza bağımlı olarak spermatogonialarda DNA hasarı oluşturduğu ortaya konmuştur (19). Diğer bir çalışmada ise uzun süreli borik asiti alımında testiküler atrofi olduğu ortaya konmuştur (20). Bununla birlikte daha önce ekibimiz tarafından yapılan geniş kapsamlı bir çalışmamızda aynı doz uygulaması yapılması ve aynı metodoloji uygulanması sonrasında mide, karaciğer, kalın barsaklar ve böbrekte boraks toksisitesi histolojik olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada mide, karaciğer ve böbreklerde uygulanan her dozda herhangi bir histopatolojik değişiklik yokken sadece en yüksek dozda kalın barsaklarda inflamatuvar hücre göçü olduğu ortaya konmuştur (21).

Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular bize boraksın oral yolla uzun süreli alımında testisler üzerinde doza bağımlı olarak Cadherin ekspresyonunda azalma oluşturduğunu göstermektedir. Buna karşın kan-testis bariyerinin çok önemli ögesi olan sıkı bağlantı bölgelerinin (Tight Junction) belirteci olan Claudin-1 ekspresyonunda herhangi bir dikkati çeken değişiklik olmaması boraksın kan-testis bariyerinde oldukça hafif bozulma yarattığını ancak bu bozulmanın testis fonksiyonlarını olumsuz düzeyde etkileyecek bir düzeyde olmadığını ortaya koymaktadır. Diğer yandan testosteron sentezinde önemli olan Leydig hücre sayısında LD50 dozunda bile anlamlı

değişiklik olmaması bize günlük alımda boraksın infertilite açısından risk oluşturmayacağını göstermektedir. Diğer yandan tek dozda verilen LD50x2 dozun Leydig hücre sayısında azalma yapmasına karşın kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir değişiklik olmaması da boraksa bağlı infertilite riskinin ihmal edilecek derecede düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla bu bulgular boraksın normal dozlarda günlük alımda testislerde kan-testis bariyeri üzerine toksik etkisi olmadığını, ancak yüksek oranlarda alımda azda olsa toksik etki yaratabilmesi mümkün olduğu için bilhassa çevre kirliliği açısından çok önemli önlemler alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Zbayolu G, Poslu K. Mining and Processing of Borates in Turkey. Review. Mineral Process and Extract Metal 1992; 9 (1-4): 245-254.
2. Chong G, Pueyo J, Demergasso C. Los yacimientos de boratos de Chile Review. Geol. Chile 2000; 27(1):99-119.
3. Samman S, Naghii MR, Lyons WPM, Verus AP. The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. Biol. Trace Elem. Res 1998; 66(1-3):227-35,
4. Mokhov AV, Kartashov PM, Gornostaeva TA, Asadulin AA, Bogatikov OA. Complex nanospherulites of zinc oxide and native amorphous boron in the Lunar regolith from Mare Crisium. Doklady Earth Sci 2013; 448(1) 61-63.
5. Thompson R. Industrial applications of boron compounds. Pure and App Chem 1974; 39 (4): 547.
6. Klotz JH, Moss JI, Zhao R., Davis JrLR, Patterson RS. Oral toxicity of boric acid and other boron compounds to immature cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). J. Econ. Entomol 1994; 87 (6): 1534-1536.
7. Hussain SA, Abood SJ, Gorial FI. The adjuvant use of calcium fructoborate and borax with etanercept in patients with rheumatoid arthritis: Pilot study. J Intercult Ethnopharmacol 2016; 6(1):58-64.
8. Dessordi R, Spirlandeli AL, Zamarioli A, Volpon JB, Navarro AM. Boron supplementation improves bone health of non-obese diabetic mice. J Trace Elem Med Biol 2017; 39:169-175
9. Pizzorno L. Nothing Boring About Boron. Review. Integr Med (Encinitas) 2015; 14(4):35-48.
10. Hunt CD. The biochemical effects of physiologic amounts of dietary boron in animal nutrition models. Environ Health Perspect 1994; 102(suppl 7):35-43.
11. Nakamura S, Imamichi S, Masumoto K, et al. Evaluation of radioactivity in the bodies of mice induced by neutron exposure from an epi-thermal neutron source of an accelerator-based boron neutron capture therapy system. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2017; 93(10):821-831

- 12.** Duydu Y, Başaran N, Üstündağ A, et al. Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Arch Toxicol* 2011;85(6):589-600.
- 13.** Pizent A, Tariba B, Živković T. Reproductive toxicity of metals in men. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63 Suppl 1:35-46.
- 14.** Kierszenbaum AL. Spermatogenesis In: *Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Patolojiye Giriş) Çeviri Ed: Prof. Dr. Demir R. 1.baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006:531-550.*
- 15.** Tosun M. İnsan Gonadlarının İntrauterin Gelişiminin Histolojik Değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji (TIP) Anabilim Dalı, Doktora Tezi-Konya, 1998.
- 16.** Çatav ŞS, Genç TO, Kesik OM, Küçükakyüz K. Effect of Boron Toxicity on Oxidative Stress and Genotoxicity in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bull EnvironContam Toxicol* 2018 Feb 12; doi: 10.1007/s00128-018-2292-x.
- 17.** Jin E, Ren M, Liu W, et al. Effect of Boron on Thymic Cytokine Expression, Hormone Secretion, Antioxidant Functions, Cell Proliferation, and Apoptosis Potential via the Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 Signaling Pathway *J Agric Food Chem* 2017;65(51):11280-11291
- 18.** Wei Y, Yuan FJ, Zhou WB, et al. Borax-induced apoptosis in HepG2 cells involves p53, Bcl-2, and Bax. *Genet Mol Res* 2016;15(2).
- 19.** El-Dakdoky MH, Abd El-Wahab HM. Impact of boric acid exposure at different concentrations on testicular DNA and male rats fertility. *Toxicol Mech Methods* 2013 Jun;23(5):360-7.
- 20.** Chapin RE, Ku WW. The reproductive toxicity of boric acid. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 7:87-91.
- 21.** Kabu M, Tosun M, Elitok B, Akosman MS. Histological evaluation of the effects of borax obtained from different sources in different rat organs *Int. J. Morphol* 2015;33(1):255-261.