

염모제 사용에 의한 인체림프구의 DNA 손상 변화

김영철*, 심미자*, 권정숙**

계명대학교 공중보건학과, *경도대학 피부미용학과, **안동대학교 식품영양학과

Effects of Hair Dyeing Application on the DNA Damage in Human Lymphocytes

Young-Chul Kim *, Mi-Ja Sim* and Chong-Suk Kwon**

Dept. of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

*Dept. of Beauty Aesthetician, Gyeongdo Provincial College, Kyungsangbuk-do 757-800, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Kyungsangbuk-do 760-749, Korea

ABSTRACT

To ascertain the effects of hair dyeing application on the DNA damage in human lymphocytes, a mixture of permanent black colored hair dye with the same amount of oxidant containing 6% hydrogen peroxide was used. A hair dyeing with contacting the scalp (conventional dyeing) and a hair dyeing with 3 to 4 mm away from the scalp (alternative dyeing) were applied to each 15 young healthy women. Blood was taken from the brachial vein at two sampling times, just before and 6 hours after the hair dyeing, and tail extent moment (TEM) and tail length (TL) were measured by using a comet assay. After dyeing, TL was significantly increased in both conventional dyeing group and alternative dyeing group compared with before dyeing as an average of 47% and 28%, respectively, and TL for conventional dyeing group was higher than alternative dyeing group as an average of 1.2 fold. After dyeing, TEM was significantly increased in both conventional dyeing group and alternative dyeing group compared with before dyeing as an average of 192% and 76%, respectively, and TEM for conventional dyeing group was significantly higher than alternative dyeing group as an average of 1.7 fold. Therefore, alternative dyeing application was induced to lower lymphocyte DNA damage than conventional dyeing application, and TEM was appeared to be a more sensitive tool for the measurement of lymphocyte DNA damage than TL in this study.

Key words : hair dyeing, lymphocyte DNA damage, comet assay, genotoxicity

서론

생활수준의 향상과 더불어 미적 가치를 증대시키는 수단과 패션의 일부로서 염모제 사용은 지속

적인 증가와 함께 일반화되고 있는 추세이다. 염모제를 포함한 두발용 제품의 국내시장 규모는 2001년 7,253억 원 2002년 7,968억 원으로 연간 8,000억 원대에 이르고 있으며(김하형, 2003), 최근에는 청소년과 유치원생들까지도 머리 염색을 하기에 이르렀다. 염모제 사용으로 인해 두피의 통증과 발적, 현기증, 시야 흐림 및 음성장애와 같은 여러 가

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-53-580-5931, E-mail: yckim@kmu.ac.kr

지 부작용이 보고되고 있으나(Goldberg *et al.*, 1987; Santucci *et al.*, 1994), 대부분의 사용자들은 미적인 측면에만 관심을 가지고 있으며 인체에 미칠 수 있는 건강장해에 대해서는 인식이 부족한 실정이다.

염모제는 염색지속형태에 따라 일시적, 반영구적, 영구적 염모제로 나뉘어지는데 이 중 영구적 염모제가 가장 널리 사용되고 있다. 영구적 염모제는 7~12개의 aromatic amine류 및 phenol류 성분을 함유하고 있으며 과산화수소와 혼합되어 사용된다(Marzulli and Green, 1978; Larsen *et al.*, 1992). 이들 영구적 염모제는 실험동물에서 유전자를 변이 시키거나 암을 발생시키는 성분들인 phenyldiamine, nitrophenylenediamine, aminonitrophenol, diaminotoluene 및 diaminoanisole 등을 함유하고 있으며(Ames *et al.*, 1975; Palmer *et al.*, 1977; Searle and Jones, 1977; Burnett, 1980; Sontag, 1981; Chung *et al.*, 1995), 특히 *p*-phenyldiamine (PPD), 2, 5-diaminotoluene 및 2, 5-diaminoanisole은 과산화수소와 혼합 사용할 경우 실험동물에서 강한 돌연 변이원성 또는 발암성을 나타낸다(Ames *et al.*, 1975; Rojanapo *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1990).

최근의 사람을 대상으로 한 역학조사에서도 염모제의 사용은 특정암의 발병 위험률을 높이는 것으로 나타났다. 염모제를 사용한 여성은 염모제를 사용하지 않은 여성보다 myeloma, multiple lymphoma 및 lymphocytic leukemia의 발병 위험률이 높은 것으로 조사되었고(Zahm *et al.*, 1992), Gago-Dominguez 등(2001)은 염모제를 사용하지 않은 여성보다 영구적 염모제를 한 달에 최소한 한번씩 1년 이상 사용한 여성에서 방광암 발병 위험률이 2.1배, 15년 이상 사용한 여성에서 3.3배, 10년 이상 업무에 종사한 미용사나 이발사에서는 5배 증가하였다고 보고하였다. 그리고 이 연구에서 영구적 염모제 사용자 중 흡연자는 비흡연자에 비해 방광암 발병 위험률이 3배 높은 것으로 조사되었다. Tzonou 등(1993)의 연구에서도 일년에 1회에서 4회 염색한 여성은 전혀 염색한 적이 없는 여성에 비해 난소암 발병 위험률이 1.7배, 일년에 5회 이상 염색하는 여성은 2.2배 높은 것으로 조사되었다. 따라서 이들 연구결과와 실험동물에서의 연구결과로 인하여 염모제 사용으로 인한 인체유전독성측면에서의 안전성에 대한 의혹은 초미의 관심

사가 되고 있다.

한편, 염모제 사용자에서의 인체 유전독성에 대한 연구에서 Kirkland 등(1981)과 Turanitiz 등(1983)은 림프구의 염색체변이나 DNA 손상에 있어 유의한 차이를 관찰하지 못하였다고 보고하였으나 조진아(2002)는 림프구의 DNA 손상이 유의하게 증가하였다고 보고하여 염모제의 인체 유전독성에 대한 의혹이 아직까지 지속되고 있어 염모제 사용에 따른 인체 유전독성에 대한 적절한 평가가 시급히 이루어져야 할 것으로 생각한다. 이에 본 연구는 최근의 연구에서 인체림프구의 DNA 손상을 초래하는 것으로 보고되어진 기존의 두피접촉 도포방법과 그리고 기존의 두피접촉 도포방법보다 인체유전독성이 적을 것으로 기대되는 대안의 두피접촉 도포방법을 인체에 적용한 후 염색전과 염색 후에 혈액을 채혈하여 염색시술방법에 따른 림프구의 DNA 손상정도를 관찰함으로써 염모제의 인체유전독성 정도를 비교 평가해 보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

경북에 거주하는 젊은 여성을 대상으로 실험내용과 방법을 구두나 전화를 통하여 설명한 후 본 연구에 동의를 한 사람 중에서, 흡연력이 없고 최근 6개월간 약물 및 비타민 복용을 하지 않았고 모발염색 경험이 없는 15세에서 21세 사이의 건강한 여성 30명을 선발하여 2003년 6월 13일에서 동년 7월 28일 기간동안에 본 연구를 위한 염색을 1회 실시하였다.

2. 염색 및 채혈

국내에서 시판되는 영구적 염모제 중에서 성분이 알려진 A회사의 동일제품의 흑색 염모제에 6%의 과산화수소가 함유된 산화제 동일량을 혼합하여 통상적으로 시술하고 있는 기존의 두피접촉 도포방법(15명, 17.2±1.3세)과 두피에서 3~4mm 떨어진 대안의 두피접촉 도포방법(15명, 16.8±1.5세)을 적용하였다. 10~15분 동안 염색을 실시한 후 40분 동안 상온에서 자연 방치한 다음 삼푸와

Table 1. Composition of the hair dye used in the experiment

Ingredients	%
<i>p</i> -Phenylenediamine	1.8
<i>p</i> -Amionophenol	0.3
<i>m</i> -Amionophenol	0.1
Resorcinol	1.0
Aqueous ammonia	2.5
Deionized water	50.0
The others	44.3

린스로 세척하였다. 본 실험에 사용된 염모제의 성분은 Table 1과 같으며 Table 1에서 기타 성분은 산화방지제, 점증제, 계면활성제, 점도보존제, 이온영양제, 보습제, 철분보충제, 유연제, 향 등으로 구성되어 있다.

혈액은 임상병리사 2명이 염색직전과 염색 후 6시간에 상완정맥에서 10~20 mL를 채혈하여 heparin으로 처리된 진공시험관에 취한 후 즉시 림프구를 분리하여 실험에 바로 사용하였다.

3. 림프구의 분리

혈액 10 mL를 원심분리 (2,200 × g, 15분, 4°C)하여 상등액의 혈장을 분리하였고 적혈구 위층의 buffy coat를 취하여 phosphate buffered solution (PBS)으로 현탁한 후, 동량의 Histopaque 1077 위에 올려놓고 4°C, 700 × g에서 30분간 원심 분리하여 림프구를 분리하였다. 분리한 림프구의 일부를 PBS로 세척과 원심분리를 2회 반복한 다음 PBS로 현탁시켜 comet assay용 시료로 사용하였다.

4. DNA 손상 측정

DNA손상은 Singh 등(1988)의 방법을 수정 보완한 comet assay로 측정하였다. Fully frosted slide에 1% HMP agarose (100 μL)를 덮어 40~50°C에서 수분간 건조하였다. 혈액 10 mL로부터 분리한 림프구를 PBS에 현탁하여 슬라이드 당 10⁴개의 림프구를 1% LMP agarose와 혼합하여 도포하고 커버글라스를 덮어 4°C에서 10분간 방치한 다음 lysis buffer (pH 10)에 1시간, unwinding buffer (pH 13)에 30분간 두었다가 전기영동 (25V/300 mA, 20분)하였다. 전기영동 후 시료를 중화시키고 ethidium bro-

mid로 염색하여 형광현미경 (200 ×, DM IL, Leica) 하에서 ‘Komet 5.0’ image analysis software (Kinetic Imaging, UK)를 사용하여 tail length (TL)와 tail extent moment (TEM)로 DNA의 손상 정도를 분석하였다. 이 실험에서는 각각의 시료에 2개씩의 슬라이드를 만들어 각 슬라이드 당 50개씩의 림프구에 대한 DNA image를 분석하였다. TL과 TEM의 계산공식은 다음과 같다.

$$TL (\mu m) = Tail\ extent\ (tail\ distance\ from\ center\ position\ of\ head\ extent) - Head\ extent / 2$$

$$TEM = TL \times Tail\ DNA\ density\ (\%) / 100$$

5. 통계처리

실험 결과의 자료분석은 SPSSWIN (v10.0) 통계 프로그램을 사용하였다. 두피접촉 도포군 및 두피미접촉 도포군에 있어서 염모제 도포시술전과 시술후의 수치 값 차이 검정은 paired t-test로 분석하였고, 염모제 도포시술 후 두피접촉 도포군과 두피미접촉 도포군 사이의 수치 값 차이 검정은 t-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

영구적 염모제를 기존의 두피접촉 도포방법 (conventional dyeing)과 대안의 두피미접촉 도포방법 (alternative dyeing)으로 15세에서 21세 사이의 젊은 여성의 모발에 1회 시술하여 염색 전과 염색 후 6시간에 림프구에서 DNA 손상정도를 comet assay에 의해 TEM과 TL을 사용하여 비교 분석한 결과는 Table 2 및 Fig. 1과 같다.

TEM의 경우 염색 후 두피접촉 도포군은 염색 전에 비해 약 192% 유의하게 증가하였고 (p < 0.01) 두피미접촉 도포군은 염색 전에 비해 약 76% 유의하게 증가하였다 (p < 0.01). TL의 경우에는 염색 후 두피접촉 도포군은 염색 전에 비해 약 47% 유의하게 증가하였고 (p < 0.01) 두피미접촉 도포군은 염색 전에 비해 약 28% 유의하게 증가하였다 (p < 0.001). 본 연구에서 TEM과 TL 모두 염색 후 염색 전에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이러한 연구결과는 22~70세 남성 및 여성을 대상으로

Table 2. Effects of hair dyeing application on the lymphocyte DNA damage in young women

Groups	Variables	Before dyeing	After dyeing
Conventional dyeing	Tail extent moment ¹⁾	0.25 ± 0.04	0.73 ± 0.54**
	Tail length ²⁾	5.94 ± 0.60	8.71 ± 2.74**
Alternative dyeing	Tail extent moment	0.25 ± 0.06	0.44 ± 0.23**
	Tail length	5.81 ± 0.66	7.42 ± 1.51***

Each value represents the mean ± S.D. of 15 young women. The value with an asterisk is significantly different from before dyeing value by paired t-test (**: p < 0.01, ***: p < 0.001).

Unit: ¹⁾ No unit, ²⁾ μm

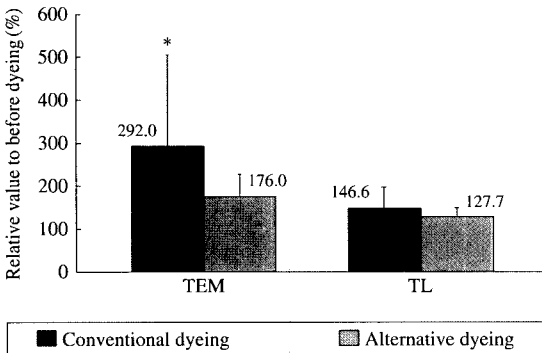


Fig. 1. Effects of hair dyeing application on the lymphocyte DNA damage 6 hours after dyeing compared with before dyeing in young women. Each bar represents the relative value (%) of 6 hours after dyeing to before dyeing and the value is the mean and standard deviation of 15 young women. The value with an asterisk is significantly different from the alternative dyeing value by t-test (*: p < 0.05).

자가 선택한 염모제를 1회 시술하여 염색 전과 염색 후(6시간과 7일)에 SCE 방법에 의해 말초림프구의 염색체 손상 정도를 비교한 결과 유의한 차이를 관찰하지 못하였던 Kirkland 등(1981)의 연구보고와 17~43세 남성미용사를 대상으로 TL을 사용한 comet assay에 의하여 말초림프구의 DNA 손상 정도가 대조군과 유의한 차이가 없었다는 Sardas 등(1997)의 연구보고와는 상반되며, TM을 사용한 comet assay법에 의해 영구적 염모제 1회 사용자에서 염색 후 6시간에 림프구의 DNA 손상이 유의하게 증가하였다는 조진아(2002)의 연구보고와는 일

치한다. 이와 같은 서로 상반된 연구결과는 연구에 사용된 염모제의 종류, 측정방법 및 연구대상이 다른데 기인한 것으로 생각된다. 최근 들어 선진 각국에서는 유전독성, 발암성 및 노화 등의 연구분야에서 DNA 손상정도를 각각의 세포수준에서 형광염색에 의해 눈으로 직접 확인할 수 있는 방법인 일명 comet assay라 불리는 단세포 전기영동법(single cell gel electrophoresis assay: SCGE)을 널리 사용하고 있다(Rojas *et al.*, 1999; Moller *et al.*, 2000). Comet assay는 유전독성에 관한 연구에 많이 사용되어 온 염색체 이상, 소핵검사, 자매염색분체 교환(sister chromatid exchange: SCE) 방법의 결과와 상관성이 매우 높으면서 이들 방법에 비해 손쉽고 간단하며 민감도가 매우 높은 유전독성 시험방법으로서, 특히 tail length의 이용보다는 tail length와 tail의 형광광도(DNA량)를 고려한 tail moment의 이용이 보다 정확하고 민감한 것으로 알려져 있다(Hellman *et al.*, 1995; Wojewodzka *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000). 그리고 염모제의 인체 유전독성정도는 영구적 염모제가 반영구적 및 일시적 염모제 보다 어두운색 염모제가 밝은색 염모제 보다 높게 나타나고, 염모제를 처음 사용한 나이가 어릴수록 사용빈도와 사용기간이 길수록 그리고 흡연을 하는 사람에서 높게 나타난다(Zahm *et al.*, 1992; Gago-Dominguez *et al.*, 2001).

본 연구에서 TEM은 염색 후 두피접촉 도포군이 염색 후 두피미접촉 도포군에 비해 약 1.7배로 유의하게 높게 나타났으며(p < 0.05), TL은 염색 후 두피접촉 도포군이 염색 후 두피미접촉 도포군에 비해 약 1.2배로 높게 나타났으나 두 군간에는 유의한 차이가 없었다. 따라서 TL과 TEM 모두에서 두피접촉 도포시술이 두피미접촉 도포시술에 비해 림프구의 DNA 손상을 많이 초래하는 것을 확인할 수 있었으며, TEM이 TL보다 민감한 유전독성지표로 나타났다. 모발에 도포된 염모제 성분은 모발을 통하여 진피에 있는 피지선이나 모낭까지 흡수되어 진피 결합조직에 있는 혈관이나 림프관으로의 확산을 통해 전신순환계로 들어가며, 두피에 도포된 염모제 성분은 표피의 각질층을 통해 진피에 흡수되어 전신순환계로 들어간다(Wolfram and Maibach 1985; Steiling *et al.*, 2001; Genina *et al.*, 2002). 본 연구에서 두피접촉 도포시술이 두피미접촉 도포시술보다 림프구의 DNA 손상을 많이 초래

한 것은 두피접촉 도포 피술자에서는 모발 외에 피부를 통해서도 염모제 성분이 흡수되었기 때문에 전신순환계로 들어간 염모제 성분의 양이 두피미접촉 도포 피술자보다 많았던 것이 일차적인 원인으로 작용하였기 때문으로 생각된다. 염모제 성분은 인체에 흡수된 후 acetylation 포함 반응을 거쳐 주로 소변을 통해 배출되며 PPD는 흰쥐피부에 도포시 N, N'-diacetyl-p-phenylenediamine으로 대사 되어 소변으로 약 70%, 대변으로 약 30% 배출된다 (Mitsuo and Yasushi, 1979; Wang and Tsai, 2003). p-Toluenediamine의 경우 과산화수소와 혼합하여 인체피부에 도포시 N-N'-diacetyl-p-toluenediamine으로 대사되어 3일 후까지 소변에서 검출되고 5~8시간 후에 가장 고농도로 검출되는 것으로 보고되어져 있다 (Kiese and Rauscher, 1968). 이에 본 연구에서는 염색 후 6시간에 혈액을 채혈하여 검사시료로 사용하였다. 한편, 염모제 성분인 PPD와 영구적 염모제의 산화제로서 사용되는 과산화수소는 그 자체의 독성뿐만 아니라 독성 중간대사산물과 대사과정 중 생성되는 free radical이나 활성산소들 (reactive oxygen species: ROS)에 의해 생체세포의 손상 및 DNA의 손상을 야기하며 (Anderson *et al.*, 1994; Kasamatsu *et al.*, 1996; Cebulska-Wasilewska *et al.*, 1998; Gichner 2003), PPD는 과산화수소와 혼합 사용할 경우 Bandrowski's base와 같은 산화형 PPD를 생성하여 PPD보다 강한 돌연 변이성 또는 발암성을 나타내는 것으로 보고되어져 있다 (Corbett, 1973). 따라서 본 연구에서 영구적 염모제의 두피미접촉 도포시술이 두피접촉 도포시술보다 림프구의 DNA손상을 적게 가져온 것은 두 시술방법간에 염모제 성분들의 인체내 흡수량의 차이로 인해 야기된 산화스트레스 정도의 차이에 의해 나타난 결과로 사료되어지며 이에 대한 연구규명 또한 필요한 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 흡연력이 없고 최근 6개월간 약물 복용 및 비타민 복용을 하지 않았고 모발염색 경험이 없는 건강한 젊은 여성 30명을 대상으로 국내에서 시판되는 영구적 염모제 중에서 성분이 알

려진 동일제품의 흑색 염모제에 6%의 과산화수소가 함유된 산화제 동일량을 혼합하여 통상적으로 시술하고 있는 기존의 두피접촉 도포방법 (15명, 17.2 ± 1.3 세)과 두피에서 3~4 mm 떨어진 대안의 두피미접촉 도포방법 (15명, 16.8 ± 1.5 세)을 1회 적용하여 염색전과 염색 후 6시간에 림프구의 DNA 손상정도를 비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

TL에 의한 DNA 손상정도의 경우, 두피접촉 도포군에서 염색 후 염색 전에 비해 약 47% 유의하게 증가하였고 두피미접촉 도포군에서는 염색 후 염색 전에 비해 약 28% 유의하게 증가하였다. 염색 후 두피접촉 도포군은 염색 후 두피미접촉 도포군에 비해 약 1.2배로 높게 나타났다. TEM에 의한 DNA 손상정도의 경우 두피접촉 도포군에서 염색 후 염색 전에 비해 약 192% 유의하게 증가하였고 두피미접촉 도포시술에서는 염색 후 염색 전에 비해 약 76% 유의하게 증가하였다. 염색 후 두피접촉 도포군은 염색 후 두피미접촉 도포군에 비해 약 1.7배로 유의하게 높게 나타났다. 따라서 두피미접촉 도포시술이 두피접촉 도포시술에 비해 림프구의 DNA 손상을 적게 초래하는 것을 확인할 수 있었으며, TEM이 TL보다 민감한 유전독성지표로 나타났다. 따라서 본 연구에서 기존의 두피접촉 도포시술보다 인체에 유전독성이 적은 것으로 나타난 두피미접촉 도포시술을 대안적인 모발염색방법으로 적극 권장하는 것이 바람직할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 김하형. 2003. 두발용 제품 시장규모 7,968억원, 화장품신문[검색 2003. 10. 26], 인터넷주소:<http://www.hjp.co.kr/cgi-bin2/media.cgi?id=18746&keyword=염모제>.
- 조진아. 염색 피술자에서의 단세포영동법 (comet assay)을 이용한 DNA 손상의 변화, 석사학위논문, 고려대학교, 2002.
- Ames BN, Kammen HO and Yamasaki E. Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975; 72(6): 2423-2427.
- Anderson D, Yu TW, Phillips BJ and Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay, Mutation

- Research 1994; 307: 261–271.
- Burnett C. Evaluation of toxicity and carcinogenicity of hair dyes, *J. Toxicol. Environ. Health* 1980; 6: 247–257.
- Cebulska-Wasilewska A, Nowak D, Niedzwiedz W and Anderson D. Correlations between DNA and cytogenetic damage induced after chemical treatment and radiation, *Mutation Research* 1998; 421: 83–91.
- Chung K-T, Murdock CA, Stevens Jr. SE, Li Y-S, Wei C-I, Huang T-S and Chou MW. Mutagenicity and toxicity studies of *p*-phenylenediamine and its derivatives, *Toxicology Letters* 1995; 81: 23–32.
- Corbett JF. Role of *m*-difunctional benzene derivatives in oxidative hair dyeing, I. Reaction with *p*-diamines, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1973; 24: 103–134.
- Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan J-M, Yu MC and Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk, *Int. J. Cancer* 2001; 91: 575–579.
- Genina EA, Bashkatov AN, Sinichkin YP, Kochubey VI, Lakodina NA, Altschuler GB and Tuchin VV. *In vitro* and *in vivo* study of dye diffusion into the human skin and hair follicles, *Journal of Biomedical Optics* 2002; 7(3): 471–477.
- Gichner T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco cellular and acellular comet assays, *Mutation Research* 2003; 535: 187–193.
- Goldberg BG, Herman FF and Hirata I. Systemic anaphylaxis due to an oxidation product of *p*-phenylenediamine in a hair dye, *Ann. Allergy* 1987; 58(3): 205–208.
- Hellman B, Vaghef H and Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay, *Mutation Research* 1995; 336: 123–131.
- Kasamatsu T, Kohda K and Kawazoe Y. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and sub-cellular systems using the comet assay, *Mutation Research* 1996; 369: 1–6.
- Kiese M and Rauscher E. The absorption of *p*-toluenediamine through human skin in hair dyeing, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1968; 13: 325–331.
- Kirkland DJ, Honeycombe JR, Lawler SD, Venitt S and Crofton-Sleigh C. Sister-chromatid exchanges before and after hair dyeing, *Mutation Research* 1981; 90: 279–286.
- Larsen WG, Jackson EM, Barker MO, Bednarz RM, Engasser PG, O'Donoghue MN and Strauss JS. A primer on cosmetics, *J. Am. Acad. Dermatol.* 1992; 27(3): 469–484.
- Marzulli FN and Green S. Hair dye toxicity, *J. Environ. Path. Toxicol.* 1978; 1: 509–530.
- Mitsuo N and Yasushi T. Distribution, excretion and metabolism of *p*-phenylenediamine in rats, *Yakugaku Zasshi* 1979; 99(11): 1149–1153.
- Moller P, Knudsen LE, Loft S and Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 1005–1015.
- Palmer KA, Denunzio A and Green S. The mutagenic assay of some hair dye components, using the thymidine kinase locus of L5178Y mouse lymphoma cells, *J. Environ. Path. Toxicol.* 1977; 1: 87–91.
- Rojanapo W, Kupradinum P, Tepsuwan A, Chutimataewin S and Tanyakaset M. Carcinogenicity of an oxidation product of *p*-phenylenediamine, *Carcinogenesis* 1986; 7(12): 1997–2002.
- Rojas E, Lopez MC and Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications, *Journal of Chromatography B* 1999; 722: 225–254.
- Santucci B, Cristaudo A, Cannistraci C, Amantea A and Picardo M. Hypertrophic allergic contact dermatitis from hair dye, *Contact Dermatitis* 1994; 31: 169–171.
- Sardas S, Aygun N and Karakaya AE. Genotoxicity studies on professional hair colorists exposed to oxidation hair dyes, *Mutation Research* 1997; 394: 153–161.
- Searle CE and Jones EL. Effects of repeated applications of two semi-permanent hair dyes to the skin of A and DBA_f mice, *Br. J. Cancer* 1977; 36: 467–478.
- Singh NP, Mccoy MT, Tice RR and Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research* 1988; 175: 184–191.
- Sontag JM. Carcinogenicity of substituted-benzenediamines (phenylenediamines) in rats and mice, *J. Natl. Cancer Institute* 1981; 66(3): 591–602.
- Steiling W, Kreutz J and Hofer H. Percutaneous penetration/dermal absorption of hair dyes *in vitro*, *Toxicology in Vitro* 2001; 15: 565–570.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C and Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35: 206–221.
- Turanitz K, Kovac R, Tuschl H and Pavlicek E. Investigations on the effect of repeated hair dyeing on sister chromatid exchanges, *Fd. Chem. Toxic.* 1983; 21(6): 791–793.

- Tzonou A, Polychronopoulou A, Hsieh C-C, Rebelakos A, Karakatsani A and Trichopoulos D. Hair dyes, analgesics, tranquilizers and perineal talc application as risk factors for ovarian cancer, *Int. J. Cancer* 1993; 55: 408-410.
- Wang L-H and Tsai S-J. Simultaneous determination of oxidative hair dye *p*-phenylenediamine and its metabolites in human and rabbit biological fluids, *Analytical Biochemistry* 2003; 312: 201-207.
- Wasserman WW and Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 5361-5366.
- Watanabe T, Hirayama T and Fukui S. The mutagenic modulating effect of *p*-phenylenediamine on the oxidation of *o*- or *m*-phenylenediamine with hydrogen peroxide in the Salmonella test, *Mutation Research* 1990; 245: 15-22.
- Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR and Szumiel I. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline comet assay, *Mutation Research* 1999; 440(1): 19-25.
- Wolfram LJ and Maibach HI. Percutaneous penetration of hair dyes, *Arch. Dermatol. Res.* 1985; 277: 235-241.
- Zahm SH, Weisenburger DD, Babbitt PA, Saal RC, Vaught JB and Blair A. Use of hair coloring products and the risk of lymphoma, multiple myeloma, and chronic lymphocytic leukemia, *American Journal of Public Health* 1992; 82(7): 990-998.