دراسة العلاقة بين لون صبغات الشعر وتأثيراتها في الزجاج على الخط الخلوي HEK293T

وفاء اليونس* **صوفي بركيل**** **شادي سكريه*****

الملخص

خلفية البحث وهدفه: تعد صبغات الشعر من مستحضرات التجميل الشائعة الاستخدام، وذلك مع الشكوك التي تحيط بسلامتها إذ لم يتم إثبات تأثيراتها الضارة بعد. جرت دراسة ستة من مستحضرات صبغات الشعر الدائمة حملت الألوان: البني المتوسط والبني المكثف والأسود والأحمر الغامق والأشقر الدخاني والأشقر البيج، كما وصفت على عبواتها التجارية. تحرت الدراسة سمية الجزء الممتص من الصبغات في الزجاج على خلايا الخط الخلوي HEK293T.

مواد البحث وطرائقه: حضرت المحاليل المستخدمة في معالجة الخلايا بوساطة خلية فرانزFranz Cell، بحيث طبقت صبغة الشعر على غشاء الخلية فترة 45 دقيقة، وبعد ذلك حفظ المحلول المستقبل. عولجت خلايا الخط الخلوي بكميات متزايدة من المحلول المستقبل من خلية فرانز، وحضنت بعدها الخلايا المعالجة والشاهد مدة 24 ساعة بحاضنة تؤمن درجة حرارة 37 درجة مئوية وغاز ثنائي أكسيد الكربون بتركيز 5%، وجرى اختبار عيوشية الخلايا بعد المعالجة باستعمال اختبار MTT.

النتائج: أظهرت النتائج زيادة إحصائية في عدد الخلايا عند إضافة محاليل الصبغات ذات اللون الأشقر بدرجتيه واللون الأسود والأحمر، بينما لم تكن الزيادة التي سببتها صبغة الشعر ذات اللون البني المكثف ذات دلالة إحصائية، وانفردت الصبغة ذات اللون البني المتوسط بإنقاص عدد الخلايا.

الاستنتاج: عليه فإن صبغات الشعر ذات اللون الأشقر بدرجتيه واللون الأحمر والأسود محرضة للنمو في الزجاج، أما الصبغة ذات اللون البني المتوسط فهي على العكس مثبطة للنمو، بينما عُدّت الصبغة ذات اللون البني المكثف الصبغة الأكثر سلامة، وذلك وفقا للتراكيب التي حددتها الشركة المصنعة للصبغات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: صبغات الشعر، خلية فرانز، خلايا HEK293T، اختبار MTT

*طالبة دكتوراه – كلية الطب البشري جامعة دمشق.
**أستاذ – كلية الطب البشري جامعة دمشق
***أستاذ – كلية الطب البشري جامعة دمشق.

Study of the relationship between the color of hair dyes and their effects in vitro on the HEK293T cell line

Wafaa Al-younes* **Sophie barguil**** **Chadi soukkarieh*****

Abstract

Background & Aim: Hair dyes are commonly cosmetic preparations used to color hair. Despite the debates about their safety, there are no data confirming their hazards yet. Six permanent hair dyes with the colors: medium brown, dark brown, black, dark red, smoky blond and beige blond as described on the commercial container were studied. The study evaluated the toxicity of the absorbed portion of hair dyes on HEK 293T cell line in vitro.

Materials & Method: The solutions used in treatments were prepared by Franz cell, through applying the hair dyes of cell membrane for 45 mins and then the receptor fluids were preserved. The cell line was treated with four volumes of dyes solutions that were prior ordered. Then the treated cells and the control were incubated at 37°C in 5% CO2 incubator for 24 hours, then the cell viability was tested by MTT assay.

Results: The results showed a statistical increase in cell number when adding the dyes solutions of blond color in two bands, red and black colors. Whereas no statistical significant increasing caused by dark brown color was found. Only the brown color caused a decrease in the number of cells.

Conclusion: Consequently, the studied dyes of blond color in the two bands, red and black color were inducer to cell growth in vitro. On the contrary, the medium brown dye was an inhibitor. Dark brown dye was considered as the safest, with regard to the composition of the studied dyes that were determined by the company.

Key words: hair dyes, Franz cell, HEK293T, MTT assay.

* PhD Student - Faculty of Human Medicine, Damascus University.

** Professor - Faculty of Medicine, Damascus University

*** Professor - Faculty of Medicine, Damascus University

المقدمة:

تعد صبغات الشعر الصناعية من مستحضرات العناية الشائعة الاستخدام حاليا من قبل مختلف الأعمار بعد أن كان يقتصر استخدامها على الأشخاص المتقدمين بالعمر بهدف تغطية الشعر الأبيض. حيث إن تعدد درجاتها وألوانها ساهم بزيادة انتشارها لأغراض تجميلية، على الرغم من تركيبتها الكيمائية والتي تكون من مزيج من المواد التي من الممكن أن تكون ضارة بالصحة أو الخطرة في بعض الأحيان (Nawalage & Pathiratne, 2020; Towle et al., 2017)

تصنف صبغات الشعر الصناعية إلى صبغات دائمة وصبغات غير دائمة وصبغات مؤقتة، وتشكل صبغات الشعر الدائمة حوالي 80% من صبغات الشعر المنتشرة نظرا للميزات التي تقدمها للمستخدم وأهمها مقاومتها للعوامل الخارجية (Zhang et al., 2020). تتشكل المركبات الملونة لصبغات الشعر الدائمة من تفاعلات أكسدة بين مكونين أساسيين: الأول يدعى عامل الطليعة precursor agents وهو عبارة عن حلقة عطرية تحوي متبادلات معطية للإلكترونات من مجموعة الهيدروكسي أو الأمين في الموقع أورثو أو بارا، أما الثاني فيدعى العامل المقترن coupling agents ويتكون أيضاً من حلقة عطرية إلا أن متبادلاتها المعطية

للإلكترونات تتوضع في الموقع ميتا، وتجري عمليات الأكسدة هذه داخل الشعرة بوجود عامل مؤكسد كماء الأوكسجين، وذلك ضمن وسط قلوي يؤمن درجة pH=9.5 لإجراء التفاعل (Chisvert et al., 2018; de Souza et al., 2019)، وتختلف نسبة وجود عامل الطليعة حسب لون الصبغة فهي تتراوح بين 0.05% في الدرجات الفاتحة إلى 1.5% في الدرجات الداكنة، ما يعني أن نسبة وجود الأمينات العطرية في الدرجات الداكنة من الممكن أن تزيد 30 مرة عن الدرجات الفاتحة (Nohynek et al., 2004).

يعد مركب 2،5– ثنائي أمين التولوين من أشهر المركبات التي تدخل كعامل طليعة في هذا النوع من الصبغات، حيث أُعتمد في العديد من البلدان ومنها الدول الأوروبية كبديل لمركب البارا فينيلين ثنائي الأمين الذي كان يستخدم بشكل أساسي كعامل طليعة في صبغات الشعر الدائمة والذي يمكن أن يسبب حساسية. إذ أظهرت العديد من الاختبارات المجراة على مركب 2،5–ثنائي أمين التولوين سلامة استخدامه ومحدودية تأثيراته المحسسة مقارنة بسابقه (Burnett et al., 2010; Meisser et al., 2020; Scheman et al., 2011).

هذا وقد أجريت العديد من الدراسات للتحري عن الأثر السمي الذي تسببه مستحضرات صبغات الشعر من خلال اختباره في الزجاج وعلى الكائن الحي. وقد توافقت نتائج الدراسات المنجزة في الزجاج على الأثر السام للخلايا الذي تسببه مختلف التراكيز المطبقة من صبغات الشعر حتى بالتراكيز الأقل من تلك المسموح بتواجده في الأشكال التجارية أحياناً (Maiti et al., 2016; Tafurt-Cardona et al., 2015). في حين أشارت الدراسات المخبرية على حيوانات التجربة إلى ارتباط مركبات الصبغة بإحداث السرطان عند إعطائها بتراكيز عالية فموياً، بينما لم تكن هناك علاقة ما بين التطبيق الجلدي وخطورة الإصابة بالسرطان، وذلك بحسب ما أشارت الجمعية الأمريكية للسرطان (The American Cancer Society medical and editorial content team, 2020) . أما مؤتمر السمية الوطني (NTP) الذي جرى عام 2011 فقد توصل إلى إمكانية أن تكون مركبات صبغات الشعر مسرطنة بناء على ما تم الإخبار عنه في العديد من الدراسات الوبائية حول ارتباط صبغات الشعر بحدوث السرطانات عند الأشخاص المتعاملين معها إضافة إلى المستهلكين، إلا أن

الوكالة الدولية لبحوث السرطان IRAC لم ترَ أن ما قدم من أدلة كافٍ لتصنيف صبغات الشعر على أنها مركبات مسرطنة، ووجهت نحو إجراء المزيد من الاختبارات لتوضيح التأثيرات المرتبطة باستخدام صبغات الشعر (Committee & Sccs, 2010; Llanos et al., 2017; NTP, 2011) وهذا ما تم تناولته هذه الدراسة بوساطة اختبار تراكيب متنوعة من الصبغات بآلية جديدة بوساطة دراسة تأثير الجزء الممتص من صبغات الشعر في الزجاج على خلايا الخط الخلويHEK293T وربط هذا التأثير بلون الصبغة.

مواد البحث وطرائقه:

المواد المستخدمة: وسط الاستنبات الخلوي Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ومصل الجنين البقري fetal bovine serum (FBS) وصادات حيوية من البنسللين والستربتومايسيpenicillin/streptomycin (شركة بيوسيرا Biosera INC ، الفيليبينPhilippines)، محلول أزرق التريبانTrypan Blue 0.5% و MTT (شركة سيغماSigma، الولايات المتحدة الأمريكية United State)، دي ميتيل سلفوكسيد Dimethyl Sulphoxide (DMSO) 99.8% (شركة أتوم ساينتفك Atom Scientific، بريطانياUnited Kingdom)، صبغات شعر دائمة تجارية تحوي جميعها على مركب 2،5–ثنائي أمين التولوين كعامل طليعة ومركب ميتا– أمينو فينول كعامل مقترن، إضافة إلى مجموعة أخرى من العوامل المقترنة تنوعت بين المستحضرات المدروسة بحيث تساهم في تغيير اللون الناتج ودرجته للحصول على الألوان البني المتوسط والبني المكثف والأسود والأحمر الغامق والأشقر الدخاني والأشقر البيج كما جاء في توصيف هذه الألوان على عبواتها التجارية.

الخط الخلوي:

عبارة عن خلايا خط خلوي لكلية جنين بشري محورة تدعى خلايا HEK293T، والتي استنبتت في وسط استنبات من DMEM المضاف له مصل جنين بقري FBS بنسبة (10%) وصادات حيوية بنسبة (1%) ضمن حاضنة تؤمن درجة حرارة تصل إلى 37 درجة مئوية وغاز ثنائي أكسيد الكربون بنسبة (5%).

المحاليل المعالجة:

حُضّرت باستخدام خلية فرانز محلية الصنع (OCDE 428, 2004)[16]، وذلك باستخدام غشاء طبيعي من جلد الجرذ واستخدام DMEM كمحلول مستقبل في الخلية. حيث طبق المستحضر النهائي لصبغات الشعر على الغشاء مدة 45 دقيقة وترك الغشاء على الخلية مدة 24 ساعة، ليؤخذ بعد ذلك المحلول المستقبل ويحفظ لحين المعالجة.

اختبار عيوشية الخلايا:

قِيست عيوشية الخلايا باستخدام اختبار MTT (Negi et al., 2017) والذي يعتمد على قدرة الخلية الحية على تحويل Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide بوساطة أنزيم السوكسينات ديهيدروجيناز succinate dehydrogenase الموجود في المتقدرات إلى بلورات الفورمازون الأرجواني غير المنحل، والذي يحل باستعمال DMSO ومن ثم تُقاسُ شدة اللون الناتج باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجة 540 نانومتر.

زرع حوالي $15*10^3$ خلية في كل بئر من آبار طبق زرع يحوي 96 بئراً، وحُضن عند الدرجة 37 درجة مئوية بوجود 5% من ثاني أكسيد الكربون مدة 24 ساعة. طبقت بعد ذلك أربع حجوم من محاليل الصبغات المحضرة مسبقاً وهي 2.5,10,25،50 مكرولتر على الخلايا المزروعة (تعكس

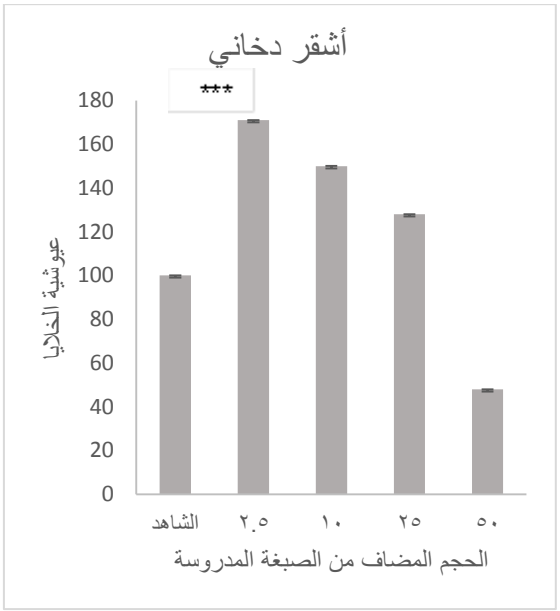
هذه الحجوم تراكيز متزايدة من محاليل الصبغات المستقبلة من خلية فرانز) بحيث يكون الحجم النهائي لوسط الاستنبات في البئر 100 مكرولتر. وحضنت الخلايا المعالجة وخلايا غير معالجة أخرى شاهدة لمدة 24 ساعة. أضيف بعد ذلك 15 مكرولتر من محلول MTT إلى كل بئر وحضنت مدة 4 ساعات، قبل أن تُحل بلورات الفورمازون المتشكلة بمحلول DMSO، لتقرأ النتائج بعد ذلك عند طول موجة 540 نانومتر.

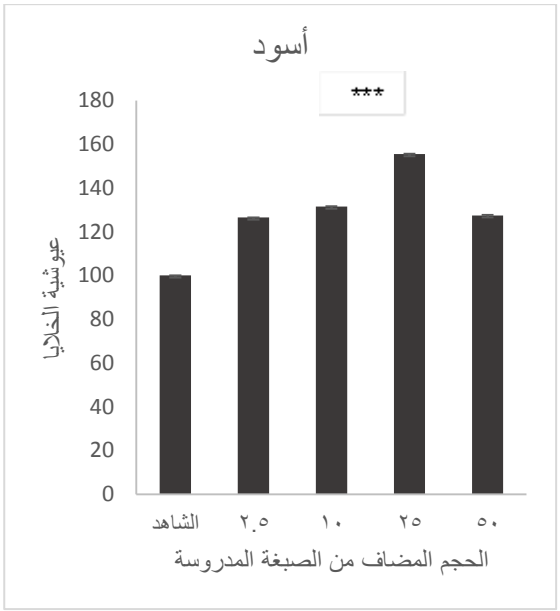
الدراسة الإحصائية:

عُبّرَ عن النتائج باستخدام المتوسط الحسابي والانحراف المعياري، ودرست النتائج الإحصائية باستخدام برنامج SPSS باستخدام one way ANOVA وذلك عند قيمة P <0.05.

النتائج:

أظهرت نتائج معالجة الخلايا بتراكيز متزايدة من محاليل الصبغات المختلفة زيادة متفاوتة في معدل عيوشية الخلايا المعالجة بالصبغات المدروسة بمختلف ألوانها باستثناء اللون البني وذلك بالمقارنة مع عيوشية الخلايا الشاهدة – كما يظهر الشكل (1).





الشكل (1): مخططات بيانية لأثر محاليل صبغات الشعر المدروسة على عيوشية الخط الخلوي HEK293T وذلك عند إضافة أحجام متزايدة 2.5، 10، 25، 50 مكرولتر من كل صبغة إلى حجم نهائي قدره 100 مكرولتر من وسط الزرع. مثلت النتائج بقيم المتوسطات الحسابية ± الانحراف المعياري لثلاث تجارب منفصلة. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

أظهرت الصبغة ذات اللون الأشقر البيج وكذلك الصبغة ذات اللون الأشقر الدخاني زيادة في عيوشية الخلايا قاربت 180% و170% على التوالي، وذلك بفارق احصائي كبير عند أقل حجم مضاف وهو 2.5 مكرولتر. لتتناقص بعد ذلك عيوشية الخلايا مع زيادة الحجم المضاف من محلول الصبغة لتصل إلى النصف بالمقارنة مع الشاهد عند إضافة الحجم 50 مكرولتر. وهذا ما لوحظ أيضاً في محلول الصبغة ذات اللون الأسود، فقد ظهرت زيادة إحصائية في عيوشية الخلايا متناسبة مع الحجم المضاف بلغت أعلى قيمة لها عند الحجم 25 مكرولتر بفارق إحصائي كبير. فيما كانت الزيادة في عيوشية الخلايا متدرجة عند إضافة محلول الصبغة ذات اللون الأحمر، وأظهرت فارق إحصائي عند التركيز 10 دون أن تتجاوز نسبة عيوشية الخلايا 140%، لتتناقص بعدها هذه النسبة تدريجياً متناسبةً مع التركيز دون أن يتسبب الحجم الأكبر المضاف من محلول الصبغة 50 مكرولتر في خفض قيم عيوشية الخلايا إلى ما دون الشاهد.

أما بالنسبة لمحلول الصبغة ذات اللون البني المكثف فلم تكن زيادة العيوشية عند إضافة الحجم 10 و25 و50 مكرولتر ذات فارق جوهري مقارنة بالشاهد، في حين أن اللون البني المتوسط سبب تناقص في عيوشية الخلايا وبفارق إحصائي بدا صغيراً عند التراكيز الأولية إلا أن إضافة حجم 50 مكرولتر من محلول الصبغة نتج عنه انخفاض عيوشية الخلايا وبفارق إحصائي كبير.

المناقشة:

يعد مركب 2،5- ثنائي أمين التولوين من أهم عوامل الطليعة التي تم التوجه إليه على أنه المركب الأكثر سلامة، خاصة بعد الانتقادات التي طالت مركب PPD نظرا لتأثيراته المحسسة من جهة وقدرته على تحريض تكوين الجذور الحرة في الجسم من جهة أخرى والتي حدت من استخدامه في بعض الدول.

يمكن تفسير الاختلاف في سلوك الخلايا عند إضافة محاليل الصبغات بارتباط ذلك بمكونات مستحضر الصبغة المدروسة، وبالتالي تأثير نواتج التفاعل في انقسام الخلايا. فبالنسبة للصبغات ذات اللون الأشقر بدرجتيه البيج والدخاني واللتان تسببتا بأعلى زيادة في نمو الخلايا وبفارق إحصائي كبير، فإنها تُعدّ مواد محرضة لنمو الخلايا وإن هذه الزيادة في عدد الخلايا تسببت في استهلاك سريع للوسط المغذي أثناء فترة الحضن المطبقة؛ ما أدى إلى نفاد المغذيات الضرورية لبقاء الخلايا وبدء تموتها بمعدل يتناسب مع الزيادة المتوقعة للخلايا مع زيادة التركيز، وهذا ما يفسر التناقص التدريجي لنمو الخلايا بالتراكيز الأعلى، علماً أن أعدادها بقيت أعلى من الشاهد بداية ثم هبطت إلى النصف عند أعلى إضافة؛ هذا يبرر سمية الخلايا عند التركيز 50 مكرولتر.

وكذلك الصبغات ذات اللون الأسود والأحمر الغامق محرضة لنمو الخلايا، إلا أن هذه الزيادة كانت أكثر بالنسبة للصبغة ذات اللون الأسود أكثر منه في الصبغة ذات اللون الأحمر، حيث تزايدت أعداد الخلايا تدريجيا بشكل متناسب مع الحجوم المضافة ثم بدأت بالتناقص مع نفاد مغذيات الوسط أثناء فترة الحضن.

أما بالنسبة للصبغات ذات اللون البني بدرجاته فقد لوحظ أن تأثيرها مختلف عن الألوان الأخرى للصبغات، إذ لا يمكن عَدّ الصبغة ذات اللون البني المكثف محرضة للنمو

مع الزيادة التي سببتها؛ إذ إن هذه الزيادة لم تكن ذات دلالة إحصائية، وبقي معدل نمو الخلايا عند تطبيق جميع الحجوم مقارباً لمعدل نمو الشاهد، ما يمكن عَدّه دليلا على سلامة هذا اللون بتركيبته المدرجة على العبوة. في حين أن اللون البني المتوسط أظهر تناقص ذو دلالة إحصائية في عدد الخلايا، ما يدل على سمية هذا التركيب على الخلايا إذ سبب إضافة الحجم 50 مكرولتر قتل ما يقارب النصف.

وبذلك تخالف نتائج دراستنا على الصبغات ذات اللون الأشقر والأسود والبني المكثف مع ما توصل إليه سواتي وزملاؤه *Swati et al.* في الدراسة التي أجراها عام 2016 والتي توصلت إلى أن للصبغات تأثير سام في الخلايا، وتوافقت مع نتائج دراسة اللون البني المتوسط.

ويلاحظ بأن أعلى عيوشية للخلايا أعطاها اللون الأشقر بدرجاته عند إضافة الحجم 2.5 مكرولتر، تلاه اللون الأسود عند إضافة حجم 25 مكرولتر ثم الأحمر عند إضافة 10 مكرولتر، بينما لم تكن الزيادة في نمو الخلايا التي سببها اللون البني المكثف في أي من الحجوم المضافة ذات فارق جوهري بالمقارنة مع الشاهد، وأظهر اللون البني المتوسط سمية خلوية حتى عند إضافة حجم 2.5 مكرولتر فقط.

وبمقارنة هذه النتيجة مع الدراسات السابقة المتعلقة بالسمية المرتبطة بلون الصبغة المستخدمة والتي كانت في معظمها دراسات وبائية، نجد أن دراسة Ohno *et al.* في اليابان عامي 1982 و1985 والدراسة التي قام بها Zheng *et al* والتي ركزت على الألوان الداكنة توصلت إلى أن الخطورة المرتبطة بصبغات الشعر الداكنة قليلة أو غير موجودة (*Hair Dye Exposure and Cancer — an Epidemiological Review*, n.d.; Ohno et al., 1985; Zheng et al., 2002) ، وهذا ما يمكن أن نعدّه متوافقاً مع نتائج الصبغات ذات اللون البني ومخالف للصبغة ذات اللون الأسود، أما دراسة Mehmet *et al.* التي أجراها على نواتج استقلاب الصبغات والتي توصل فيها إلى أن مستقلبات صبغات الشعر خاصة الداكنة هي أكثر سمية ومسرطنة (Akyüz & Ata, 2008) فهي على العكس تتوافق مع نتيجة اللون الأسود وتخالف اللون البني بالنظر إلى أن الاستقلاب الجلدي مشابه إلى حد ما للاستقلاب الكبدي ولكن حجمه أقل ، وبالنسبة للدراسات التي قام بها Koutros *et al.* و Stella *et al.* و Martine *et al.* والتي أشارت إلى عدم وجود ارتباط ما بين خطورة الصبغة ولونها فهي تخالف نتائج دراستنا إذ إن سلامة الصبغة أو سميتها أو تحريضها لنمو الخلايا كان مرتبط باللون المستخدم (S. Koutros et al., 2009; Stella Koutros et al., 2011; Ros et al., 2012; Zheng et al., 2002)

الاستنتاج:

توصلت الدراسة إلى اختلاف تأثير صبغات الشعر باختلاف ألوانها، بدءاً من التأثير المحرض لنمو الخلايا والذي أظهرته الألوان الأشقر بدرجتيه والأحمر والأسود، إلى التأثير المثبط لنمو الخلايا والذي أظهره اللون البني المتوسط، علماً بأن هناك صبغات لا تؤثر على نمو الخلايا وبالتالي يمكن عُدّها الأكثر سلامة كاللون البني المكثف، وذلك وفقاً للتراكيب التي اعتمدتها الشركة المصنعة لها. وبذلك يوصى بتوجيه مزيد من الدراسات على ألوان صبغات الشعر المختلفة الأخرى بدرجاتها المتعددة لمعرفة تأثيرها السمي في الخلايا، كما ينصح بإجراء الاختبارات على تراكيب مختلفة لنفس اللون واعتماد الأقل سمية منها للاستعمال.

References

1. Akyüz, M., & Ata, Ş. (2008). Determination of aromatic amines in hair dye and henna samples by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *47*(1), 68–80. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.011
2. Burnett, C. L., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Klaassen, C. D., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Andersen, F. A. (2010). Final amended report of the safety assessment of toluene-2,5-diamine, toluene-2,5-diamine sulfate, and toluene-3,4-diamine as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, *29*(3_suppl), 61S-83S. https://doi.org/10.1177/1091581810361964
3. Chisvert, A., Miralles, P., & Salvador, A. (2018). Hair Dyes in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. In *Analysis of Cosmetic Products: Second Edition* (Second Edi). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63508-2.00008-4
4. Committee, S., & Sccs, C. S. (2010). *Scientific Committee on Consumer Safety reaction products of oxidative hair dye ingredients formed during hair dyeing processes* (Issue September). https://doi.org/10.2772/26692
5. de Souza, J. C., Silva, B. F. da, Morales, D. A., Umbuzeiro, G. de A., & Zanoni, M. V. B. (2019). Assessment of the autoxidation mechanism of p-toluenediamine by air and hydrogen peroxide and determination of mutagenic environmental contaminant in beauty salon effluent. *Science of the Total Environment*, *685*, 911–922. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.252
6. *Hair dye exposure and cancer — an epidemiological review*. (n.d.).
7. Koutros, S., Baris, D., Bell, E., Zheng, T., Zhang, Y., Holford, T. R., Leaderer, B. P., Landgren, O., & Zahm, S. H. (2009). Use of hair colouring products and risk of multiple myeloma among US women. *Occupational and Environmental Medicine*, *66*(1), 68–70. https://doi.org/10.1136/oem.2008.041053
8. Koutros, Stella, Silverman, D. T., Baris, D., Zahm, S. H., Morton, L. M., Colt, J. S., Hein, D. W., Moore, L. E., Johnson, A., Schwenn, M., Cherala, S., Schned, A., Doll, M. A., Rothman, N., & Karagas, M. R. (2011). Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study. *International Journal of Cancer*, *129*(12), 2894–2904. https://doi.org/10.1002/ijc.26245
9. Llanos, A. A. M., Rabkin, A., Bandera, E. V., Zirpoli, G., Gonzalez, B. D., Xing, C. Y., Qin, B., Lin, Y., Hong, C. C., Demissie, K., & Ambrosone, C. B. (2017). Hair product use and breast cancer risk among African American and White women. *Carcinogenesis*, *38*(9), 883–892. https://doi.org/10.1093/carcin/bgx060
10. Maiti, S., Sasmal, K., Sinha, S. S., & Singh, M. (2016). Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on E. coli, human blood cells and Allium cepa suggests a greater toxic potential of hair dye. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *124*, 248–254. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.028
11. Meisser, S. S., Altunbulakli, C., Bandier, J., Opstrup, M. S., Castro-Giner, F., Akdis, M., Bonefeld, C. M., Johansen, J. D., & Akdis, C. A. (2020). Skin barrier damage after exposure to paraphenylenediamine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *145*(2), 619-631.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.11.023
12. Nawalage, S. K., & Pathiratne, A. (2020). Application of cytogenetic model Allium cepa for screening potential cytogenotoxicity of herbal-based hair dyes. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 1–7. https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1795502
13. Negi, C. K., Pharm, M. S., & Toxicology, R. (2017). *MTT cell proliferation assay MTT assay*. *44*(8028), 1–2.
14. Nohynek, G. J., Fautz, R., Benech-kieffer, F., & Toutain, H. (2004). *Toxicity and human health risk of hair dyes*. *42*, 517–543. https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.003
15. NTP. (2011). *Chromium hexavalent compounds. Report on carcinogens. U.S. Department of Health and Human Services. National Toxicology Program*. 106–109.
16. OCDE 428. (2004). OECD - GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Absorption: in vitro Method. *Test*, *April*, 1–8.
17. Ohno, Y., Aoki, K., Obata, K., & Morrison, A. S. (1985). Case-control study of urinary bladder cancer in Metropolitan Nagoya. *National Cancer Institute Monograph*, *MONOGR. 69*, 229–234.
18. Ros, M. M., Gago-Dominguez, M., Aben, K. K. H., Bueno-De-Mesquita, H. B., Kampman, E.,

Vermeulen, S. H., & Kiemeney, L. A. (2012). Personal hair dye use and the risk of bladder cancer: A case-control study from the Netherlands. *Cancer Causes and Control*, *23*(7), 1139–1148. https://doi.org/10.1007/s10552-012-9982-1

19. Scheman, A., Cha, C., & Bhinder, M. (2011). Alternative hair-dye products for persons allergic to para-phenylenediamine. *Dermatitis*, *22*(4), 189–192. https://doi.org/10.2310/6620.2011.00010
20. Tafurt-Cardona, Y., Suares-Rocha, P., Fernandes, T. C. C., & Marin-Morales, M. A. (2015). Cytotoxic and genotoxic effects of two hair dyes used in the formulation of black color. *Food and Chemical Toxicology*, *86*, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.010
21. The American Cancer Society medical and editorial content team. (2020). Cancer.org. 1.800.227.2345. *American Cancer Society*, 88.
22. Towle, K. M., Grespin, M. E., & Monnot, A. D. (2017). Personal use of hair dyes and risk of leukemia: a systematic literature review and meta-analysis. *Cancer Medicine*, *6*(10), 2471–2486. https://doi.org/10.1002/cam4.1162
23. Zhang, Y., Birmann, B. M., Han, J., Giovannucci, E. L., Speizer, F. E., Stampfer, M. J., Rosner, B. A., & Schernhammer, E. S. (2020). Personal use of permanent hair dyes and cancer risk and mortality in US women: Prospective cohort study. *The BMJ*, *370*. https://doi.org/10.1136/bmj.m2942
24. Zheng, T., Holford, T. R., Mayne, S. T., Owens, P. H., Boyle, P., Zhang, B., Zhang, Y. W., & Zahm, S. H. (2002). Use of hair colouring products and breast cancer risk: A case-control study in Connecticut. *European Journal of Cancer*, *38*(12), 1647–1652. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00138-7