

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizin Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung experimenteller Pruritusmodelle: Neue Anwendungsmöglichkeiten von
Hautprovokationstests mit Histamin, Cowhage (*Mucuna pruriens*) und Capsaicin**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Sylwia Monika Lehmann (geb. Wiercimak)

aus Połczyn-Zdrój, Polen

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Abstrakt | 3 |
| 2. Einleitung | 4 |
| 3. Zielstellung..... | 8 |
| 4. Material und Methoden | 8 |
| 5. Ergebnisse | 10 |
| 6. Diskussion | 16 |
| 7. Zusammenfassung | 20 |
| 8. Referenzen..... | 21 |
| 9. Eidesstattliche Versicherung | 25 |
| 10. Anteilserklärung Publikationen | 26 |
| 11. Publikation 1..... | 28 |
| 12. Publikation 2..... | 40 |
| 13. Publikation 3..... | 49 |
| 14. Lebenslauf | 57 |
| 15. Publikationsliste | 60 |
| 16. Danksagung | 60 |

1. Abstrakt

Chronischer Juckreiz ist eine komplexe, multidimensionale Empfindung, die viele dermatologische Erkrankungen, wie z. B. atopische Dermatitis (AD), Psoriasis oder Urtikaria begleitet. Dabei reduziert der chronische Juckreiz die Lebensqualität Betroffener erheblich und ist, aufgrund eines Mangels gezielt wirkender Therapien, oft schwierig zu behandeln. Experimentelle Modelle mit induziertem Juckreiz dienen als wichtiges Werkzeug bei der Erforschung zugrundeliegender Pathomechanismen und bei der Testung neuer Therapieoptionen. Zwei gut etablierte Juckreiz-Modelle sind der *Skin Prick Test* (SPT) mit Histamin und die Hautprovokation mit Cowhage (*Mucuna pruriens*). Cowhage stimuliert den Protease-aktivierten Rezeptor 2 - assoziierten Weg, welcher in der Pathophysiologie des AD-assozierten Juckreizes eine Rolle spielen kann. Ein weiterer Mediator, Capsaicin, aktiviert den Transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V Subtyp 1 (TRPV1), der ebenfalls im Rahmen des atopischen Juckreizes involviert sein kann. Zurzeit fehlt jedoch ein standardisiertes und reproduzierbares Verfahren für eine Capsaicin-Applikation, welches als Modell für TRPV1-induzierten Juckreiz dienen könnte. Die hier vorliegende Arbeit hatte zum Ziel:

- 1) durch SPT mit Histamin und Capsaicin sowie durch Hautprovokation mit Cowhage ausgelösten Juckreiz und Juckreiz-assoziierte Wahrnehmungen zu vergleichen. Für diesen Zweck wurde der SPT mit Capsaicin als Modell für TRPV1-induzierten Juckreiz in gesunden Probanden validiert;
- 2) den Zusammenhang zwischen Juckreiz und Flare-Reaktionen in drei experimentellen Juckreiz-Modellen zu untersuchen;
- 3) die Ergebnisse von Hautprovokationen mit Histamin und Cowhage in gesunden Probanden und AD Patienten zu vergleichen und zu prüfen, ob diese Tests als diagnostische Biomarker der AD genutzt werden können.

In Rahmen eines Pilotexperiments wurde zunächst eine Capsaicin-Konzentration ermittelt, die bei 8 gesunden Probanden zuverlässig einen reproduzierbaren Juckreiz hervorruft. Des Weiteren wurden Hautprovokationen mit Histamin (10 mg/ml), Capsaicin (8%) und Cowhage bei 31 gesunden Probanden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Hautprovokationen mit Histamin, Capsaicin und Cowhage unterschiedliche Juckreizantworten (Juckreizdauer und Profil assoziierter Empfindungen) und Flare-Reaktion induzieren. Eine Charakterisierung der Reaktionsprofile zu diesen Provokationen kann dabei helfen, sie als Modelle von pruriginösen Erkrankungen zu etablieren. Ein Zusammenhang zwischen Juckreiz und Größe der Flare-Reaktion bestand nur bei Histamin. Dieses Ergebnis impliziert, dass in experimentellen Bedingungen die Fläche der Flare-Reaktion als objektive Ergänzung zu rein subjektiven Juckreizbewertungen angewendet werden könnte. In einem weiteren Hauptexperiment wurde ein SPT mit Histamin (10 mg/ml) und eine Hautprovokation mit Cowhage bei 22 AD Patienten und 18 gesunden Probanden durchgeführt. AD Patienten entwickelten signifikant kleinere Histamin-induzierte Flare-Reaktionen und längeren Cowhage-induzierten Juckreiz als gesunden Probanden. Beide Parameter zeigten gute diagnostische Eigenschaften und könnten in Zukunft dabei helfen die Diagnosestellung der AD zu unterstützen.

Abstract

Chronic itch is a complex, multidimensional experience, accompanying many skin conditions, e.g., atopic dermatitis (AD), psoriasis or urticaria. Pruritus significantly reduces the quality of life and is often, in absence of targeted therapies, difficult to treat. The experimental models of induced itch are an important tool to investigate the complex underlying pathomechanisms and to test new therapeutic options. Two well established itch models are the *Skin Prick Test* (SPT) with histamine and skin provocation with cowhage (*Mucuna pruriens*). Cowhage activates the itch pathway associated with a

protease activated receptor 2, which can be involved in pathophysiology of AD-associated itch. Another mediator, capsaicin, activates transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), which can also be involved in atopic itch. Currently a standardized and reproducible procedure which could be used as a model of TRPV1-induced itch is lacking. The here presented work has the following goals:

- 1) to compare the itch- associated sensations induced by SPT with histamine and capsaicin and skin provocation with cowhage. For this purpose, SPT with capsaicin was validated in healthy volunteers as a model of TRPV1- induced itch;
- 2) to test the link between itch and flare reactions in three experimental models of itch;
- 3) to compare the results of skin provocations with histamine and cowhage between healthy subjects and patients with AD and to investigate whether these tests may be used as diagnostic markers of AD.

During a pilot experiment a concentration of capsaicin evoking the most reproducible itch was determined in 8 healthy subjects. Further the skin provocations with histamine (10 mg/mL), capsaicin (8%) and cowhage were performed in 31 healthy subjects. The results showed that provocations with histamine, capsaicin and cowhage induce different itch responses (in terms of duration and profile of accompanying sensations) and different flare reactions. The characteristics of profiles of responses to these skin provocations can help to establish them as models for itchy dermatoses. The link between pruritus und flare existed only for histamine. This finding implicates that in experimental settings flare area could be used as a surrogate parameter for otherwise subjective itch assessment. In the further experiment SPT with histamine (10 mg/mL) and provocation with cowhage were performed in 22 AD patients and 18 healthy subjects. AD patients developed significantly smaller histamine-induced flare and longer cowhage-induced itch than healthy subjects. Both parameters showed good diagnostic properties and could help to support diagnosis of AD.

2. Einleitung

Pruritus ist ein häufiges Symptom, das mit vielen Hauterkrankungen einhergeht (1). Mehr als 90% der Patienten mit atopischer Dermatitis (AD), fast 77% der Patienten mit chronischer idiopathischer Urtikaria und mehr als 73% der Patienten mit Psoriasis berichten Juckreiz im Verlauf der vergangenen 7 Tage (2). Die Juckempfindung wird von Patienten mit AD, Psoriasis und Urtikaria als das am stärksten belastenden Symptom betrachtet (3-5) und kann erhebliche Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden und die Lebensqualität haben (2, 6-8). Chronischer Juckreiz führt zu Schlafstörungen, Konzentrationsproblemen und ist mit einem erhöhten Ausmaß an Depression, Angststörungen und Suizidgedanken verbunden (2, 6, 7). Zusätzlich berichten die Betroffenen oft über begleitende unangenehme Symptome wie Schmerzen, Hitzegefühl oder Brennen (6, 8, 9).

Die Behandlung des chronischen Juckreizes stellt eine Herausforderung dar. Das liegt an der heterogenen Ätiologie der zugrunde liegenden Erkrankungen, der Entwicklung der peripheren und zentralen Sensibilisierung (Chronifizierungsprozesse), als auch am Mangel wirksamer, spezifischer Therapien (10). Antihistaminika werden im klinischen Alltag häufig als antipruritische „erste Hilfe“ bei juckenden Dermatosen verwendet, obwohl ihre Wirksamkeit nur für wenige Erkrankungen (wie Urtikaria oder allergische Reaktionen, in deren Pathogenese Histamin eine Hauptrolle spielt) durch Studien bestätigt wurde (1). Bei anderen Hauterkrankungen, wie z.B. atopische Dermatitis oder Psoriasis, in deren Pathophysiologie Histamin nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, ist die Therapie mit Antihistaminika wenig oder gar nicht effektiv (1). Viele der in den Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des chronischen Pruritus empfohlenen Therapieoptionen basieren auf kleinen

Studien oder Fallserien und können deswegen nur als „Off-Label-Therapie“ eingesetzt werden (1). Die Durchführung weiterer, randomisierter, kontrollierter Studien ist dringend notwendig, um neue antipruritische Substanzen zu untersuchen. Für diesen Zweck und um die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu erforschen sind experimentelle Pruritusmodelle unverzichtbar (11). Einer der meist untersuchten Mediatoren für Pruritus ist Histamin (11, 12). Histamin wird von Hautmastzellen gespeichert und freigesetzt. Daher spiegeln Histamin-Hautprovokationen vor allem jene Juckreizformen wider, die durch degranulierende Mastzellen hervorgerufen werden, wie z.B. im Verlauf von Urtikaria, allergischen Reaktionen oder der Mastozytose (13). Der Juckreiz wird durch Aktivierung von Histamin 1- und -4 Rezeptoren (H1-R und H4-R) an den Nervenfasern ausgelöst (14). Eine Subpopulation von unmyelinisierten mechanoinsensitiven C-Nervenfasern (CMi) leitet den Juckreiz ins Zentralnervensystem (ZNS) weiter (15). Da Histamin eine intakte Hautbarriere nicht penetriert, wird es mittels intradermaler Injektion, Iontophorese, Skin Prick Test (SPT) oder mithilfe inaktivierter und mit Histamin beschichteter Cowhage Härchen appliziert (16, 17). Für die Juckreizforschung ist der SPT besonders vorteilhaft. Die Methode ist einfach durchführbar und ermöglicht die Deposition von kleinen Mengen des Pruritogens (10^{-6} ml) in dem Bereich der dermoepidermalen Grenzzone, in welchem sich die Endigungen unmyelinisierter C-Fasern befinden (18). Es wurde gezeigt, dass der SPT mit 1% Histamin im Vergleich zur Iontophorese einen stärkeren Juckreiz hervorruft und eine höhere Reproduzierbarkeit hat (16). Darüber hinaus induziert der SPT mit Histamin Juckreiz ohne begleitende Schmerzempfindung, welcher hingegen bei intradermaler Injektion immer ausgelöst wird (16).

Ein weiteres gut etabliertes Juckreizmodell ist die Hautprovokation mit Härchen des tropischen Juckbone-Cowhage (*Mucuna pruriens*) (11, 12). Die Provokation mit Cowhage ist ein Prototyp Histamin-unabhängigen Juckreizes (12). Cowhage-induzierter Juckreiz wird von anderen peripheren Nervenbahnen weitergeleitet, als das für Histamin der Fall ist: einer Population von mechano- und hitze-sensitiven C-Fasern (polymodalen C-Fasern, CMH) und mechano-hitze-sensitiven A-Fasern (AMH) (19, 20). Die feinen Cowhagehärchen enthalten die Protease Mucunain, welche die Protease-aktivierten Rezeptoren 2 und 4 (PAR-2 und PAR-4) an den Nervenfasern aktiviert (21, 22). Es gibt Hinweise, dass der von PAR-2 vermittelte Signalweg bei der Entstehung von Pruritus und der Symptomatik der AD relevant ist (12). Bei Patienten mit AD wurde auch eine erhöhte Konzentration von Tryptase (endogener PAR-2-Agonist) in der Haut nachgewiesen (22). Darüber hinaus empfinden AD Patienten nach einer intradermalen Injektion von PAR-2-Agonisten einen stärkeren Juckreiz als gesunden Probanden (22).

Viele Juckreizmediatoren benötigen in der Signaltransduktion die Beteiligung des Transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 1 (TRPV1) (23). TRPV1 ist durch funktionelle Interaktionen mit H1R, H4R und PAR-2 auf der Ebene der intrazellulären Signalübertragung in die Transmission von sowohl Histamin-abhängigem als auch Histamin-unabhängigem Juckreiz involviert (24, 25). Einige Studien belegen die Wirksamkeit von TRPV1-Antagonisten bei der Unterdrückung des Juckreizes und der Beschleunigung der Regeneration der Hautbarriere im AD-Mausmodell (26, 27). Dies impliziert die Beteiligung von TRPV1 im Pathomechanismus des Pruritus im Rahmen der AD und macht TRPV1 zum vielversprechenden Ziel neuer antipruritisch-wirkender Substanzen. Die ersten Ergebnisse aus klinischen Studien mit menschlichen Probanden zeigen die Unbedenklichkeit der Therapie mit einem TRPV1-Antagonisten (28). Das Wirkungsprofil dieser neuen Therapieoption in AD Patienten muss noch abgewartet werden (28).

TRPV1 wird direkt durch Capsaicin sowie durch eine Reihe von Entzündungsmediatoren wie z.B. Hitze über 42 Grad Celsius oder Reduzierung des pH-Wertes aktiviert (29). Die intradermale Capsaicin-Injektion fungiert seit langem als experimentelles Schmerzmodell (30). Es wurde jedoch beobachtet,

dass sehr oberflächliche Applikationen von Capsaicin, z.B. mittels inaktivierten und mit Capsaicin durchdrungenen Cowhagehärcchen, Juckreiz auslösen und somit ein TRPV1-vermitteltes Juckreizmodell darstellen können (17, 31). Diese Applikationsmethode ist jedoch zeitaufwendig und mit dem Risiko restlicher PAR-2 Aktivitäten belastet, falls Mucunain nicht total deaktiviert wurde. Als Alternative stand bisher die Applikation von Capsaicin als Lösung in Ethanol und deionisiertem Wasser oder Creme zur Verfügung (32). Aufgrund einer deutlich längeren Expositionszeit und eines größeren Applikationsbereiches ist diese Methode mit dem oft eingesetzten Histamin-SPT nur schwer vergleichbar. Nach unserem Wissen, wurde der SPT mit Capsaicin als experimentelles Modell des TRPV1-vermittelten Juckreizes bisher nicht validiert.

Patienten die unter juckenden Dermatosen leiden, beschreiben den Juckreiz häufig als „stechende“, „krabbelnde“, „kitzelnde“ oder „brennende“ Empfindung (6-8). Möglicherweise weisen pruriginöse Erkrankungen ein für sich charakteristisches Profil von mit Juckreiz assoziierten Wahrnehmungen auf, was bisher jedoch nur in einzelnen Studien untersucht wurde (33, 34). Der chronische Juckreiz ist eine mehrdimensionale Erfahrung, bei der unter anderen sensorische, affektive oder behaviorale Aspekte berücksichtigt werden sollten (35). Das International Forum for the Study of Itch (IFSI) empfiehlt das Einsetzen von Fragebögen, die verschiedene Qualitäten des Juckreizes, besonders sensorische und affektive Dimensionen, erfassen (9, 35). Bei Patienten mit chronischem Pruritus kann das bei der präziseren Einschätzung von noch nicht ausreichend behandelten Bereichen helfen und zu einer besser angepassten Therapie beitragen (35).

Experimentell induzierter Pruritus wird ebenfalls oft von Wahrnehmungen begleitet, die mit Juckreiz assoziiert werden. Gewöhnlich wird neben der Juckreizintensität auch die Intensität von Empfindungen wie „piksend/ stechend“, „warm/heiß/brennend“ bestimmt (17, 19, 31). Man kann vermuten, dass die Mediatoren und Induktionswege, die in verschiedenen Hauterkrankungen involviert sind, unterschiedliche Profile sensorischer Qualitäten auslösen. In Anbetracht dessen könnte die Charakterisierung von Juckreizqualitätsprofilen in experimentellen Bedingungen zu einem besseren Verständnis der beteiligten Juckreizmediatoren in Pruritus-assoziierten Erkrankungen führen und schließlich zur Entwicklung einer gezielteren und effizienteren Therapie beitragen.

Der Juckreiz in chronisch entzündlichen Hauterkrankungen geht mit lokalen Entzündungsreaktionen einher. Da an den Entzündungszeichen die peripheren sensorischen Neuronen beteiligt sind, wird diese Reaktion auch als neurogene Inflammation bezeichnet. In der Urtikaria treten alle drei Komponenten der neurogenen Entzündung auf (so genannte „triple reaction“): eine Rötung an der betroffenen Stelle, danach ein Erythem, das sich in die Umgebung ausdehnt (Flare-Reaktion) und ein lokales Ödem, welches klinisch zu einer Quaddel führt.

Die lokalen Hautreaktionen werden ebenfalls in experimentellen Juckreizmodellen beobachtet. Histamin ruft eine Quaddel und Flare-Reaktion hervor (11). Eine Flare-Reaktion entwickelt sich auch nach Provokation mit Capsaicin (17). Cowhage hingegen löst keine oder nur subtile Rötungen, gelegentlich Mikroödeme, aus (11). Eine Quaddelbildung resultiert aus der direkten Wirkung von Histamin auf die postkapillaren Venolen, was zu ihrer Erweiterung und erhöhten Durchlässigkeit führt (36). Der neurologische Mechanismus, der der Flare-Reaktion zugrunde liegt, ist der Axonreflex. Flare-Reaktionen spiegeln die Erweiterung der Arteriolen durch Vasodilatoren wider, die aus afferenten Nervenfasern (infolge der antidromen Transmission des nozizeptiven Stimulus) freigesetzt worden sind (36). Die gleichzeitige orthodrome Transmission von Aktionspotenzialen in Richtung des Zentralnervensystems kodiert die sensorische Information, einschließlich des Juckreizes (15, 37). Unter Berücksichtigung der Beteiligung von sensorischen Nervenfasern, sowohl bei der Flare-Reaktion als auch bei der Entstehung vom Juckreiz, lässt sich vermuten, dass die Flare-Reaktion mit der Intensität

des Pruritus verknüpft ist und damit das Aktivierungsniveau von sensorischen Nervenfasern widerspiegelt. Wäre dies der Fall, könnte die Flare-Reaktion, die sich objektiv messen lässt, die rein subjektive Auswertung von Pruritus ergänzen.

Die derzeit verfügbaren Techniken, die auf die Einschätzung des Hautblutflusses beruhen, wie z.B. Laser Speckle Kontrast Analyse (*Laser Speckle Contrast Imaging*, LSCI), Thermographie oder Colorimetrie, ermöglichen eine präzisere Bestimmung der Vasodilatation im Sinne von Ausdehnung und Intensität, als eine rein visuelle Beurteilung der Hautrötung (11). Es existieren bislang nur vereinzelte Studien, die den Zusammenhang zwischen der Flare-Reaktion und Pruritus untersucht haben (16). Ihre Schlussfolgerungen sind nicht einheitlich oder sogar widersprüchlich (17, 31). Darüber hinaus beschäftigten sich alle Studien nur mit der Fläche der Flare-Reaktion, ohne ihre Intensität zu analysieren. Die meisten Studien haben lediglich den Zusammenhang zwischen Histamin-induziertem Flare und Juckreiz untersucht (16, 38). Bisher adressierte nur eine Studie die Verbindung zwischen Histamin-, Capsaicin-, und Cowhage-induzierter Flare-Reaktion und Pruritus (31). Nur in zwei der Studien wurden moderne Methoden zur Messung von Blutflussveränderungen eingesetzt (38, 39).

Ein besseres Verständnis des Zusammenhanges zwischen Flare-Reaktion und Juckreiz kann eine klinische Anwendung finden. Eine objektive und präzise Messung der Flare-Reaktion könnte bei der Bestimmung der Juckreizintensität bei Patienten mit chronischen pruriginösen Hauterkrankungen helfen. Eine verminderte Flare-Fläche wurde bereits als Test für eine funktionelle Beeinträchtigung von C-Fasern im Rahmen der Small-Fiber-Neuropathie eingesetzt und validiert (40).

Juckreizmodelle können bei gesunden Probanden dazu verwendet werden, um einen bestimmten Induktionsmechanismus zu reproduzieren oder neue Therapiemöglichkeiten zu prüfen. Bei Patienten, die unter juckenden Dermatosen leiden, kann der Einsatz von Juckreizmodellen darüber hinaus zu einem besseren Verständnis zugrundeliegender Interaktionen zwischen involvierten Mediatoren beitragen sowie eine veränderte Expression von Rezeptoren in betroffenen Hautarealen demonstrieren, was im Anschluss diagnostische Implikationen haben kann. Der SPT mit Histamin ist im klinischen Alltag weit verbreitet und wird als Positivkontrolle in der allergologischen Routinediagnostik eingesetzt. Er gehört zu den Standardtests bei Patienten mit Verdacht auf AD. Die AD ist eine der häufigsten Dermatosen, mit einer in vielen Regionen der Welt 20% überschreitenden Lebenszeitprävalenz (41). Die Diagnose einer AD wird fast ausschließlich durch eine detaillierte Anamnese und klinische Untersuchung gestellt. Allerdings können atypische Erscheinungsformen eine Diagnosestellung erschweren (42). Keiner von gewöhnlich bestimmten Laborparametern, wie z.B. Gesamt-IgE und spezifisches IgE, sind bei der AD spezifisch erhöht oder beim intrinsischen Subtyp der AD sogar unauffällig (43). Der SPT mit Histamin ruft Juckreiz, eine Flare-Reaktion und eine Quaddel hervor, die sich auf einfache Art und Weise messen lassen. Es wurde beobachtet, dass die Histamin-induzierte Flare-Reaktion bei Patienten mit AD im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert auftrat (44, 45). Im Gegensatz dazu, wurde nicht übereinstimmend berichtet, dass sich Quaddelbildung und empfundener Juckreiz zwischen Gesunden und AD Patienten unterscheiden (44, 46). Möglicherweise kann man aus der veränderten Reaktivität der atopischen Haut mehr Informationen ablesen, als bisher angenommen. Das diagnostische Potenzial des SPT mit Histamin wurde in der AD bisher nicht untersucht. Im Hinblick auf das andere wichtige Pruritogen, Cowhage, wurde hingegen bereits beobachtet, dass Cowhage-induzierter Juckreiz bei AD Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe innerhalb einer 5,5-minütigen Beobachtungszeit langsamer nachlässt (12). Der Einsatz der Cowhage-Hautprovokation als Instrument für die AD-Diagnose wurde bisher nicht systematisch untersucht.

3. Zielstellung

Das erste Ziel dieser Arbeit war der Vergleich von Juckreiz-assoziierten sensorischen Wahrnehmungen nach SPT mit Capsaicin und zwei gut etablierten Juckreizmodellen, SPT mit Histamin und Hautprovokation mit Cowhage. Hierzu wurde der SPT mit Capsaicin als Modell von TRPV1-vermittelten Pruritus in gesunden Probanden validiert (Publikation 1).

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Juckreiz und Flare-Reaktion, gemessen mittels LSCI und digitaler planimetrischer Morphometrie, in experimentellen Modellen mit Histamin-, Cowhage- und Capsaicin-induziertem Pruritus (Publikation 2).

Weiterhin wurde überprüft, ob sich Juckreiz und Hautreaktionen nach SPT mit Histamin und Provokation mit Cowhage zwischen gesunden Probanden und Patienten mit AD unterscheiden. Ebenso wurde das Potenzial von Hautprovokationen mit Histamin und Cowhage als Biomarker der AD untersucht (Publikation 3).

Die Ziele dieser Arbeit wurden unter besonderer Berücksichtigung möglicher neuer Anwendungsmöglichkeiten dieser Hautprovokationen in experimentellen und klinischen Bedingungen formuliert.

4. Material und Methoden

Die vorliegende Promotion besteht aus 4 Experimenten (2 Pilotexperimenten und 2 Hauptexperimenten) die nach erteilter Genehmigung der lokalen Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin (EA4/063/13) im Allergie-Centrum-Charité, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt wurden. Alle Teilnehmer haben eine Einwilligung unterschrieben.

Publikation 1 (47)

Im Rahmen der Validierung des SPT mit Capsaicin wurde zuerst ein Pilotversuch durchgeführt, um jene Konzentration von Capsaicin zu ermitteln, die bei den meisten Probanden Juckreiz auslöst. Drei Konzentrationen von Capsaicin: 2%, 4%, 8% (0.02, 0.04, 0.08 g/ml Capsaicin in 48% Polysorbat 80 in isotonischer Kochsalzlösung; Charité Apotheke, Berlin) und Negativkontrolle (48% Polysorbat 80 in isotonischer Kochsalzlösung; Charité Apotheke, Berlin) wurden mittels SPT auf den volaren Unterarmen von 8 gesunden Probanden (5 Frauen; Medianalter 40 Jahre, Interquartilsabstand: 35-44 Jahre) eingesetzt. Ein nachfolgender SPT wurde erst durchgeführt, nachdem der vorher induzierte Juckreiz abgeklungen war. Die Probanden bewerteten die Juckreizintensität auf einer Visuellen Analog-Skala (VAS) (0-100 mm) im Minutenintervall über maximal 30 Minuten.

Das zweite Pilotexperiment wurde durchgeführt, um die am häufigsten auftretenden Juckreizqualitäten zu identifizieren. Acht gesunde Probanden (4 Frauen; Medianalter 40 Jahre, Interquartilsabstand: 34-42 Jahre) nahmen teil. Auf den volaren Unterarmen wurden SPT mit Histamin (10 mg/ml; ALK-Abello, Horsholm, Denmark), Capsaicin (0.08 g/ml Capsaicin in 48% Polysorbat 80 in isotonischer Kochsalzlösung; Charité Apotheke, Berlin) und Hautprovokationen mit Cowhagehärcchen (40-45 Cowhagehärcchen über 45 Sekunden sanft auf einem 4 cm² großen Testareal gerieben (12)) in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. Die Probanden wurden gebeten die sensorischen Deskriptoren auszuwählen, die ihre Empfindung am besten widerspiegeln. Dabei standen die folgenden 17 Deskriptoren aus dem etablierten Eppendorfer Juckreizfragebogen (48) zur Auswahl: juckend, triebhaft, warm, kalt, brennend, kribbelnd, kitzelnd, pulsierend, wellenförmig, piksend, bohrend, dumpf, scharf,

betäubend, zwickend, pressend, schmerzend. Ferner konnten die Probanden weitere Deskriptoren ergänzen. Hierzu standen Freitextfelder zur Verfügung.

Für das erste Hauptexperiment wurden 31 gesunde Probanden (15 Frauen, Medianalter 28 Jahre, Interquartilsabstand: 26-34 Jahre) rekrutiert. Bei 10 Probanden bestand anamnestisch eine allergische Rhinitis oder allergisches Asthma. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomfrei. Eine Woche vor der Untersuchung durften keine Antihistaminika und Analgetika eingenommen werden. Antidepressiva, systemische und topische Steroide mussten mindestens 14 Tage vor der Hauttestung abgesetzt werden. Am Tag der Untersuchung wurden die Probanden gebeten keinen Kaffee zu trinken.

Der SPT mit Histamin, der SPT mit Capsaicin und deren Negativkontrollen sowie die Hautprovokation mit Cowhage und deren Negativkontrolle (jeweils 40-45 native Cowhagehärschen und Cowhagehärschen deaktiviert im Autoklaven- Applikationsmethode siehe oben) wurden durchgeführt. Die aktive Substanz wurde immer zusammen mit ihrer Negativkontrolle, die auf den jeweils kontralateralen Unterarm appliziert wurde, getestet. Testareale befanden sich mindestens 5 cm voneinander entfernt. Die nachfolgende Hautprovokation erfolgte nach 60 Minuten. Die Provokationsreihenfolge, die Provokationsseite (rechts vs. links), und der Applikationsbereich (proximal vs. distal) wurden randomisiert.

Die Juckreizintensität wurde auf einer VAS (0-100 mm), wie bereits im Pilotexperiment beschrieben, gemessen. Nachdem der Juckreiz abgeklungen war, haben die Probanden die allgemeine Intensität von sensorischen Juckreizqualitäten auf einer VAS (0-100 mm) bewertet. Anhand der Ergebnisse des zweiten Pilotversuchs wurden die folgenden Qualitäten eingeschlossen: juckend, triebhaft, warm, brennend, kribbelnd, kitzelnd, piksend und wellenförmig.

Der längste (*DL*) und der perpendikuläre Durchmesser (*DP*) der Flare-Reaktionen und der Quaddeln wurden mit einem Lineal 10, 20, 40, 60 und 90 Minuten nach Beginn der Provokationen gemessen. Die Flächen (in mm²) wurden anschließend berechnet ($F=DL/2 \cdot DP/2 \cdot \pi$).

Publikation 2 (49)

Auf Basis der im ersten Hauptexperiment erhobenen Daten wurden die Zusammenhänge zwischen Flare-Reaktion und Juckreiz in experimentellen Juckreizmodellen untersucht. Die genaue Charakterisierung von Probanden und Hautprovokationen entspricht der Publikation 1. In Kürze: SPT mit 1% Histamin, SPT mit 8% Capsaicin, Provokation mit 40-45 Cowhagehärschen und entsprechende Negativkontrollen wurden auf den volaren Unterarmen von 31 gesunden Probanden durchgeführt. Die Juckreizintensität wurde minütlich über einen Zeitraum von 30 Minuten mithilfe einer VAS (0-100 mm) gemessen.

Die Fläche (mm²) und Intensität (*perfusion units*, PU) des erhöhten Blutflusses wurden mittels Laser Speckle Kontrast Analyse (*Laser Speckle Contrast Imaging*, LSCI; *moorFLPI2*; *Moor Instruments, Axminster, UK*) bestimmt. Die LSCI Aufnahmen wurden vor, als auch 10, 20, 40, 60 und 90 Minuten nach den Hautprovokationen durchgeführt. Die Messmethode basiert auf der Auswertung der Veränderungen im Speckle-Muster. Die integrierte Software (*moorFLPI2-Review V4.0*; *Moor Instruments, Axminster, UK*) berechnet die daraus resultierenden Fluxwerte, um ein farbkodiertes Perfusionbild zu erzeugen. Die Fläche des erhöhten Blutflusses (mm²) auf einem Nachprovokationsbild wurde als Hautareal definiert, dessen Fluxwert den Flux-Mittelwert plus 2 Standardabweichungen (SD) innerhalb der Applikationsstelle vor Provokation überschreitet. Die maximale Intensität des Blutflusses (PU), d.h. der maximale Fluxwert nach Hautprovokation, wurde innerhalb eines vordefinierten und im

Zentrum der Applikationsstelle platzierten Bereiches (415 mm²), gemessen. Die mittlere Intensität des Blutflusses (PU) wurde auf einem Nachprovokationsbild innerhalb der Fläche des erhöhten Blutflusses gemessen. Die Fläche der Flare-Reaktion (mm²) wurde mithilfe der digitalen planimetrischen Morphometrie erfasst (*ImageJ developers, NIH, MD, USA*). Die digitalen Fotos wurden vor und 10, 20, 40, 60 und 90 Minuten nach den Hautprovokationen aufgenommen.

Publikation 3 (50)

Für das Experiment wurden 22 Patienten mit AD (12 Frauen; Medianalter 30 Jahre, Spannweite 20-42 Jahre, SCORAD Mittelwert \pm SD 34.4 \pm 14.6, Juckreizintensität anhand der VAS des SCORAD [0-10] Mittelwert \pm SD 3.9 \pm 2.2) und 18 gesunde Probanden (8 Frauen; Medianalter 29 Jahre, Spannweite 21-41 Jahre) rekrutiert. Nur Patienten mit symmetrisch ekzem-freien Arealen auf beiden volaren Unterarmen wurden eingeschlossen. Acht AD Patienten hatten anamnestisch zusätzlich eine allergische Rhinitis, 2 AD Patienten hatten zusätzlich ein allergisches Asthma und 2 AD Patienten hatten beide Erkrankungen, jedoch waren alle Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomfrei. Spätestens 2 Wochen vor der Untersuchung durften die Patienten keine topischen Steroide oder Calcineurin-Inhibitoren im Bereich der Testareale verwenden oder systemische Immunsuppressiva oder UV-Therapie erhalten. Antihistaminika wurden 1 Woche vor dem Experiment abgesetzt.

Der SPT mit Histamin (10 mg/ml) und Negativkontrolle (beide ALK-Abello, Horsholm, Denmark) und Hautprovokation mit 40-45 Cowhagehäärchen (Applikationsmethode wie oben beschrieben) wurden auf den jeweils kontralateralen volaren Unterarmen durchgeführt. Die Provokationsseiten (links vs. rechts) und Provokationszeiten (8:00-10:00, 12:00-14:00, 18:00-20:00) wurden randomisiert.

Die Juckreizintensität wurde während einer 30-minütigen Beobachtungszeit in Minutenintervallen auf einer VAS (0-100 mm) bewertet. Als Outcome-Parameter wurden die maximale Juckreizintensität, die Juckreizpersistenz (Zeit von der SPT mit Histamin oder dem Ende der Cowhage Applikation bis zum Ende der Juckreizempfindung) und die Fläche unter der Kurve (*Area under the curve, AUC*) analysiert. Nachdem der Juckreiz verschwunden war, bewerteten alle Teilnehmer die Intensität der folgenden sensorischen Deskriptoren des Eppendorfer Juckreizfragebogens auf einer VAS (0-100 mm): juckend, triebhaft, warm, kalt, brennend, kribbelnd, kitzelnd, pulsierend, wellenförmig, piksend, bohrend, dumpf, scharf, betäubend, zwickend, pressend, schmerzend (48).

Die Hautreaktion, d.h. Quaddel und Flare-Reaktion, wurden 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten nach der Provokation gemessen. Der längste (*DL*) und der perpendikuläre Durchmesser (*DP*) der Quaddel und Flare-Reaktion wurden mit einem Lineal gemessen und für die Berechnung der Fläche (mm²) (*F*) verwendet ($F = DL/2 \cdot DP/2 \cdot \pi$). Zusätzlich wurde die Fläche der Flare-Reaktion und der Quaddel mittels digitaler planimetrischer Morphometrie bestimmt, indem die Umrisse von Flare-Reaktion und Quaddel mittels ImageJ Software (*ImageJ developers, NIH, USA*) auf den digitalen Fotos von Testarealen markiert wurden. Mit Hilfe der Volumetrie (PRIMOS, GF Messtechnik GmbH, Teltow/Berlin, Germany), die eine kontaktfreie 3D-Darstellung der Hautoberfläche ermöglicht, wurde zudem das Quaddelvolumen (mm³) quantifiziert. Für die Bestimmung der Erythemintensität (*arbitrary units, AU*; 0-999) wurde ein Mexameter (Courage & Khazaka, Cologne, Germany) verwendet.

5. Ergebnisse

Die Ergebnisse des ersten Hauptexperiments wurden in zwei Publikationen veröffentlicht (47, 49). Die Ergebnisse des zweiten Hauptexperiments wurden in Publikation 3 veröffentlicht (50).

Publikation 1

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33(9):1755-61. (47)

Pilotexperimente

Der konsistenteste Juckreiz konnte mit Capsaicin in einer Konzentration von 8% ausgelöst werden. Diese Konzentration wurde daher für die weiteren Untersuchungen verwendet. Zudem wurden die folgenden sensorischen Deskriptoren am häufigsten für alle 3 Provokationsmethoden berichtet: juckend, triebhaft, warm, brennend, kribbelnd, kitzelnd, wellenförmig, piksend. Weil kribbelnd und kitzelnd sehr ähnliche sensorische Qualitäten beschreiben, wurde nur „kribbelnd“ als Deskriptor für die weiteren Experimente ausgewählt.

Hauptexperiment

Die durch den SPT mit Histamin und Capsaicin induzierte Flare-Reaktion erreichte 10 Minuten nach Testung die maximale mit einem Lineal gemessene Größe. Nach einer Hautprovokation mit Cowhage wurde keine mit einem Lineal messbare Flare-Reaktion beobachtet. Die Capsaicin-induzierte Flare-Reaktion war im Vergleich zur Histamin-induzierten Flare-Reaktion signifikant kleiner (23 % der AUC der Histamin-induzierten Flare-Reaktion, 95% KI 4-151%, *t*-Test für abhängige Stichproben, $P < 0.001$). Nur Histamin löste Quaddeln aus.

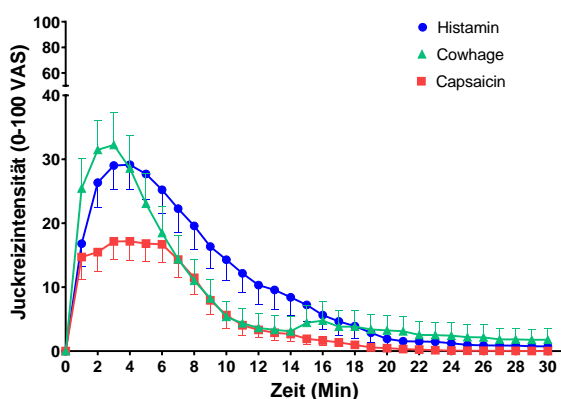


Abbildung 1. Kinetik der Juckreizintensitäten (Mittelwert \pm SEM), bewertet auf einer Visuellen Analog-Skala (VAS) von 0-100 mm, nach Hautprovokationen mit Histamin, Cowhage und Capsaicin (aus Hawro et al. 2019 (47). Mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags).

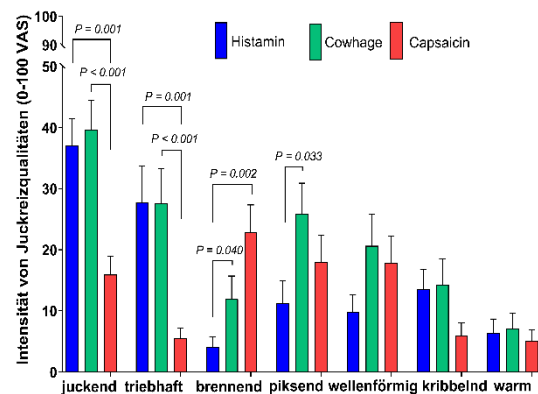


Abbildung 2. Mittelwert (\pm SEM) der Intensität von bestimmten mit Juckreiz assoziierten Empfindungen ($n=31$ gesunde Probanden), bewertet auf einer Visuellen Analog-Skala (VAS) nach Hautprovokationen mit Histamin, Cowhage und Capsaicin. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur wurde nur für die Vergleiche zwischen aktiven Substanzen durchgeführt (aus Hawro et al. 2019 (47). Mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags).

Nach SPT mit Capsaicin und Hautprovokation mit Cowhage berichteten alle Probanden Juckreiz und mindestens einer mit Juckreiz assoziierte Wahrnehmungen. Bis auf einen Probanden galt gleiches für den SPT mit Histamin. Histamin-induzierter Juckreiz dauerte statistisch signifikant länger im Vergleich zu Cowhage- (Mittelwert \pm SEM, 13.5 ± 1.4 Min. vs. 8.8 ± 1.2 Min.) und Capsaicin-induziertem Juckreiz (10.9 ± 1.0 Min.; ANOVA $P = 0.011$, Bonferroni-Korrektur, Histamin vs. Cowhage, $P = 0.005$, Histamin vs. Capsaicin, $P = 0.242$, Cowhage vs. Capsaicin, $P = 0.755$) (Abbildung 1).

Die Empfindung „juckend“ und „triebhaft“ waren weniger intensiv nach SPT mit Capsaicin als nach SPT mit Histamin und Hautprovokation mit Cowhage. Die Empfindung „brennend“ war nach Provokation mit Capsaicin und Cowhage stärker ausgeprägt als nach SPT mit Histamin. Cowhage löste eine intensive Empfindung „piksend“ aus. Die Empfindungen „wellenförmig“, „kribbelnd“ und „warm“ kamen nur schwach zum Ausdruck und waren nicht statistisch signifikant unterschiedlich zwischen den Provokationen mit Histamin, Cowhage und Capsaicin (Abbildung 2).

Publikation 2

Lehmann S, Deuring E, Weller K, Scheffel J, Metz M, Maurer M, Hawro T. Flare Size but not Intensity reflects histamine-induced itch. *Skin Pharmacol Physiol.* 2020; 33(5):244-52. (49)

Der SPT mit Histamin induzierte Juckreiz und einen erhöhten Blutfluss (gemessen mittels LSCI) (Abbildung 3). Histamin-induzierter Pruritus korrelierte mit der Flächengröße des erhöhten Blutflusses, jedoch nicht mit maximaler und mittlerer Intensität des erhöhten Blutflusses, gemessen mittels LSCI (Tabelle 1).

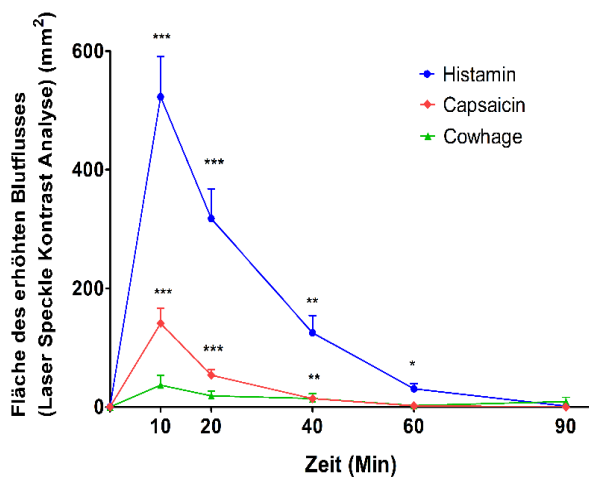


Abbildung 3. Veränderung im Blutfluss nach experimenteller Induktion von Pruritus. Kinetik der Erhöhung des Blutflusses (mm^2) in Bezug zur Baseline, gemessen mit Laser Speckle Kontrast Analyse (LSCI) über 90 Minuten nach Hautprovokationen mit Histamin, Capsaicin und Cowhage. Statistische Signifikanzen (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) dargestellt für Vergleiche zwischen Parametern vor und nach Hautprovokation (● – Histamin, ◆ – Capsaicin, ▲ – Cowhage). Dargestellt sind jeweils Mittelwert \pm SEM (aus Lehmann et al. 2020 (49)).

Mit freundlicher Genehmigung des Karger Verlags. The final, published version of this article is available at <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000508795>

Hautprovokationen mit Capsaicin und Cowhage induzierten einen Juckreiz und einen erhöhten Blutfluss, jedoch in geringerem Maße als Histamin. Histamin erhöhte den Blutfluss (Fläche des erhöhten Blutflusses, mittlere und maximale Intensität) stärker als Capsaicin ($P < 0.001$ für alle oben genannten Parameter) und Cowhage ($P < 0.001$ für alle oben genannten Parameter) in LSCI-Messungen 10 Minuten nach Provokation. Capsaicin induzierte eine größere Fläche erhöhten Blutflusses ($P = 0.001$) und höhere maximale und mittlere Intensität ($P < 0.001$) als Cowhage. Sowohl Capsaicin als auch Cowhage-induzierter Juckreiz korrelierte nicht mit den Veränderungen im Blutfluss, weder mit der Flächengröße noch mit der maximalen oder mittleren Intensität des Blutflusses gemessen mittels LSCI (Tabelle 1).

Es bestand eine moderate Korrelation zwischen der Fläche der Flare-Reaktion, bestimmt mithilfe digitaler planimetrischer Morphometrie, und Histamin-induzierten Juckreiz (Tabelle 1). Die Korrelation zwischen der Juckreizintensität (AUC) und der Fläche der Flare-Reaktion war schwächer als die Korrelation zwischen der Juckreizintensität (AUC) und der Fläche des erhöhten Blutflusses gemessen mittels LSCI (Tabelle 1). Die Fläche der Flare-Reaktion korrelierte mit der Fläche des erhöhten Blutflusses gemessen mittels LSCI 10 Minuten nach der Provokation ($r = 0.731$, $P < 0.001$).

| Substanz | Flare Parameter | Juckreiz (Pearson's r, Signifikanz) | | |
|-----------|--|--------------------------------------|---|--|
| | | maximale Intensität | Dauer | AUC |
| Histamin | Fläche der Flare-Reaktion (digitale Planimetrie) | 0.283, $P = 0.123$ | 0.406, $P = 0.023^{a)}$ | 0.409, $P = 0.022^{b)}$ |
| | Fläche des erhöhten Blutflusses (LSCI) | 0.575, $P = 0.001$ | 0.545, $P = 0.002^{a)}$ | 0.649, $P < 0.001^{b)}$ |
| | Veränderung der maximalen Intensität des Blutflusses zur Baseline (LSCI) | 0.146, $P = 0.435$ | 0.200, $P = 0.280$ | 0.196, $P = 0.291$ |
| | mittlere Intensität des Blutflusses (LSCI) | 0.053, $P = 0.777$ | 0.068, $P = 0.716$ | 0.030, $P = 0.874$ |
| Capsaicin | Fläche der Flare-Reaktion (digitale Planimetrie) | 0.338, $P = 0.063$ | 0.135, $P = 0.468$ | 0.271, $P = 0.141$ |
| | Fläche des erhöhten Blutflusses (LSCI) | 0.127, $P = 0.502$ | 0.293, $P = 0.116$ | 0.123, $P = 0.516$ |
| | Veränderung der maximalen Intensität des Blutflusses zur Baseline (LSCI) | 0.354, $P = 0.051$ | 0.212, $P = 0.252$ | 0.271, $P = 0.140$ |
| | mittlere Intensität des Blutflusses (LSCI) | 0.331, $P = 0.069$ | 0.158, $P = 0.395$ | 0.305, $P = 0.095$ |
| Cowhage | Fläche des erhöhten Blutflusses (LSCI) | 0.135, $P = 0.477$ | 0.031, $P = 0.870$ | 0.240, $P = 0.202$ |
| | Veränderung der maximalen Intensität des Blutflusses zur Baseline (LSCI) | 0.060, $P = 0.752$ | -0.010, $P = 0.958$ | 0.048, $P = 0.801$ |
| | mittlere Intensität des Blutflusses (LSCI) | -0.016, $P = 0.934$ | -0.029, $P = 0.878$ | 0.150, $P = 0.428$ |

Tabelle 1. Korrelation (Pearson) zwischen Juckreizparametern und Flare-Reaktion-Parametern, gemessen 10 Minuten nach Hautprovokationen mit Histamin, Capsaicin und Cowhage (aus Lehmann et al. 2020 (49)).

Mit freundlicher Genehmigung des Karger Verlags. The final, published version of this article is available at <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000508795>

AUC – area under the curve; LSCI – Laser Speckle Kontrast Analyse

- a) Die Korrelation zwischen der Juckreizdauer und der Fläche des erhöhten Blutflusses gemessen mittels LSCI unterschied sich nicht statistisch signifikant von der Korrelation zwischen der Juckreizdauer und der Fläche der Flare-Reaktion gemessen mithilfe digitaler Planimetrie, $P = 0.140$
- b) Die Korrelation zwischen der Juckreizintensität (AUC) und Fläche des erhöhten Blutflusses gemessen mittels LSCI war stärker als die Korrelation zwischen der Juckreizintensität (AUC) und der Fläche der Flare-Reaktion gemessen mithilfe digitaler Planimetrie, $P = 0.022$.

Publikation 3

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. *Allergy*. 2016; 71 (12): 1745-52. (50)

Anders als Cowhage, führte die Hautprovokation mit Histamin zu einer sichtbaren Flare-Reaktion und einer erhöhten Erythemintensität (gemessen mittels Mexameter), sowohl bei AD Patienten als auch in der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 4). Histamin-induzierte Flare-Reaktionen, gemessen 20 Minuten nach Hautprovokationen, waren deutlich kleiner in Patienten mit AD als bei gesunden Probanden (Abbildung 4). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Erythemintensität gemessen mittels Mexameter, oder in Quaddeldurchmesser und -volumen zwischen AD Patienten und gesunden Probanden.

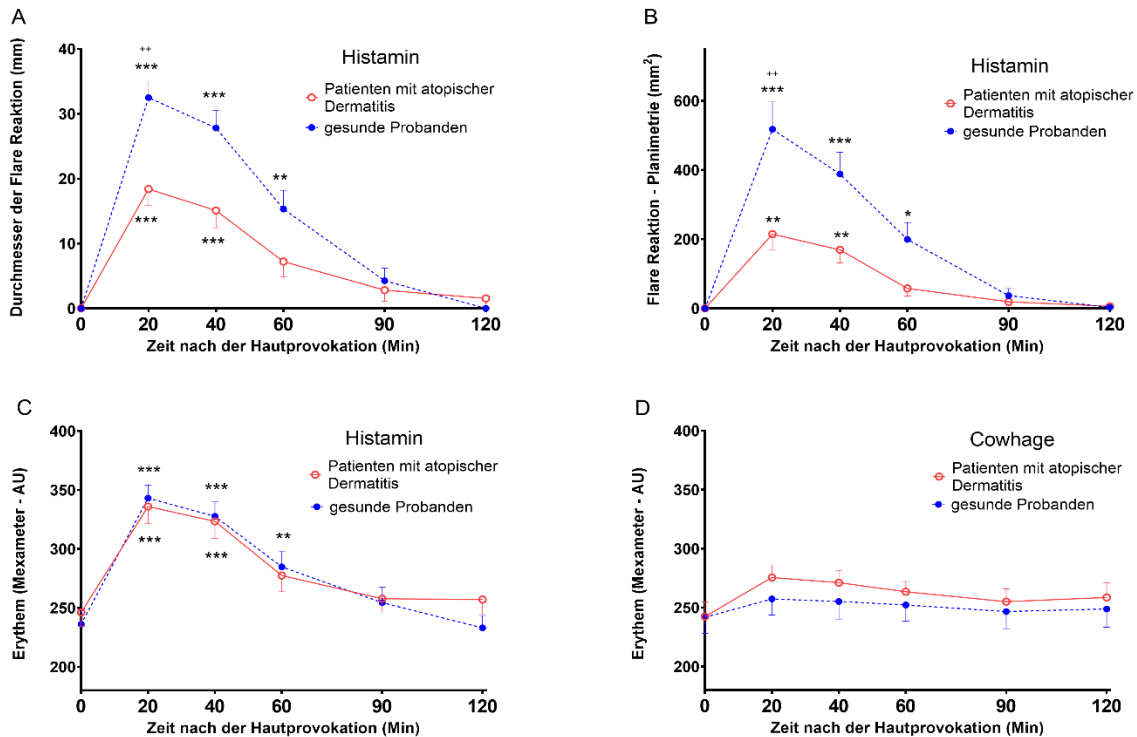


Abbildung 4. Der Durchmesser und die Fläche der Histamin-induzierten Flare-Reaktion sind kleiner bei Patienten mit atopischer Dermatitis als bei gesunden Probanden. Die Intensität des Histamin-induzierten Erythems ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen beiden Gruppen. (A) Der längste Durchmesser der Flare-Reaktion gemessen mit einem Lineal. (B) Fläche der Histamin-induzierten Flare-Reaktion bestimmt mittels digitaler Planimetrie. (C) Intensität des Erythems gemessen mittels Mexameter nach SPT mit Histamin. (D) Intensität des Erythems gemessen mittels Mexameter nach Hautprovokation mit Cowhage. Mittelwert \pm SEM. AU, „arbitrary units“. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. Baseline. ++ $P < 0.01$ Patienten mit atopischer Dermatitis vs. gesunde Probanden 20 Minuten nach Hautprovokation (aus Hawro et al. 2016 (50). Mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags).

Patienten mit AD zeigten eine deutlich verlängerte Persistenz von Cowhage-induziertem Juckreiz im Vergleich zu gesunden Probanden (eine Juckreizpersistenz von mindestens 30 Minuten wurde bei 14 von 22 Patienten mit AD und nur bei 3 gesunden Probanden beobachtet, $P < 0.01$; Abbildung 5 A, C). Die allgemeine Juckreizintensität im zeitlichen Verlauf (AUC) nach der Hautprovokation mit Cowhage war ebenfalls signifikant höher bei AD Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert \pm SEM; 746 ± 138 vs. 316 ± 52 ; $P < 0.05$) (Abbildung 5 A, D). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf die maximale Juckreizintensität zwischen AD Patienten und gesunden Probanden (Abbildung 5 A, E). Hinsichtlich aller Parameter des Histamin-induzierten Juckreizes zeigte die statistische Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit AD und gesunden Probanden.

Der längste Durchmesser von Histamin-induzierten Flare-Reaktionen gemessen mit einem Lineal 20 Minuten nach SPT sagt eine AD mit guten diskriminierenden Eigenschaften voraus (Fläche unter der ROC-Kurve 0.80, 95% KI 0.662-0.936, $P < 0.01$). Ein Durchmesser von Flare-Reaktionen von unter 20 mm erlaubt die Diagnosestellung einer AD mit einer Sensitivität von 0.59 und einer Spezifität von 0.78. Die Fläche der Flare-Reaktion bestimmt durch Messungen mit einem Lineal und digitaler planimetrischer Morphometrie zeigte ähnliche diskriminierende Eigenschaften (Fläche unter der ROC-Kurve 0.80, 95% KI 0.660-0.939, $P < 0.01$ und 0.78, KI 95% 0.628-0.927, $P < 0.01$).

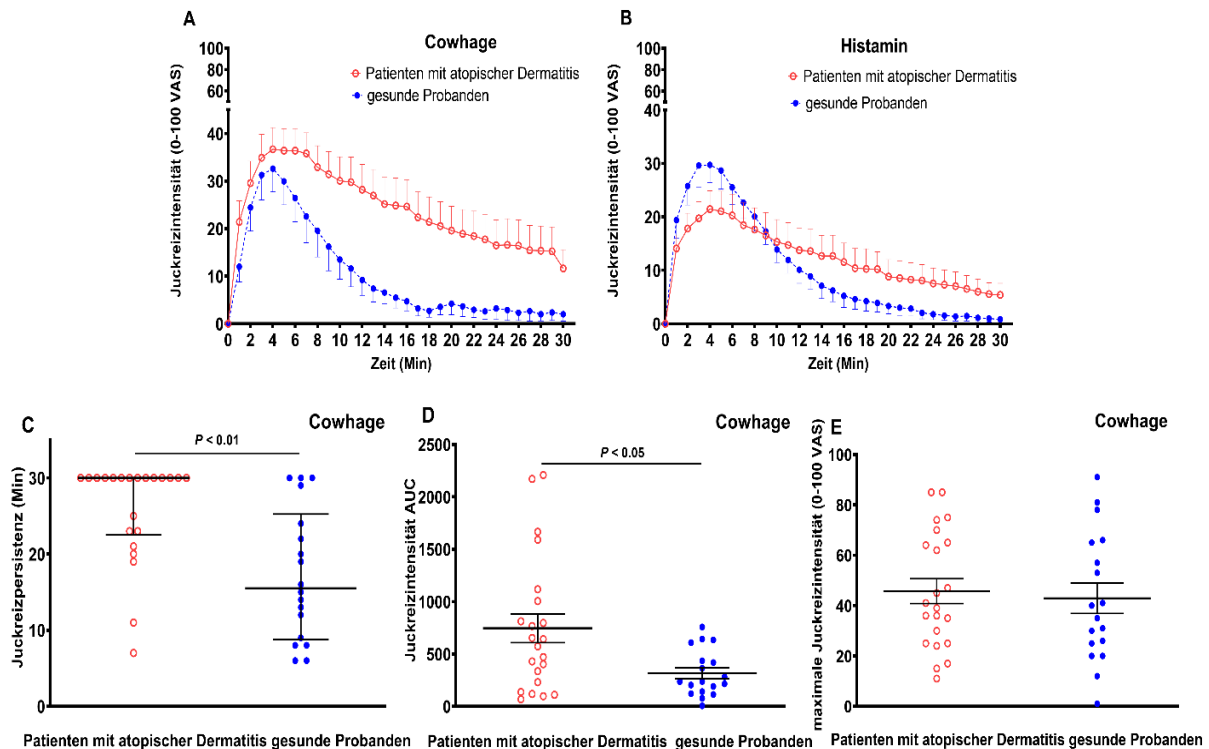


Abbildung 5. Patienten mit AD berichten über längeren Juckreiz nach Hautprovokation mit Cowhage aber nicht nach SPT mit Histamin, im Vergleich zu gesunden Probanden. (A) Zeitlicher Verlauf der Juckreizintensität bewertet auf einer Visuellen Analog-Skala (VAS) nach Hautprovokation mit Cowhage; Mittelwert \pm SEM. (B) Zeitlicher Verlauf der Juckreizintensität bewertet auf einer Visuellen Analog-Skala (VAS) nach SPT mit Histamin; Mittelwert \pm SEM. (C) Längere Persistenz von Juckreiz nach Hautprovokation mit Cowhage in AD Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppe; Median (Interquartilsabstand); Mann-Whitney U-Test, $P < 0.01$. (D) Die Fläche unter der Kurve (Area under the curve [AUC]) für Juckreizintensität nach Hautprovokation mit Cowhage ist größer bei Patienten mit AD in Vergleich zu gesunden Probanden; Mittelwert \pm SEM; Student's t Test, $P < 0.05$. (E) Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der maximaler Juckreizintensität zwischen Patienten mit AD und gesunden Probanden nach Hautprovokation mit Cowhage; Mittelwert \pm SEM (aus Hawro et al. 2016 (50). Mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags).

Die Juckreizpersistenz nach Hautprovokation mit Cowhage sagte eine AD ebenfalls mit guten diskriminierenden Eigenschaften voraus (Fläche unter der ROC-Kurve 0.78, 95% KI 0.633-0.930, $P < 0.01$). Eine Juckreizpersistenz von 30 Minuten oder länger erlaubt die Diagnosestellung einer AD mit einer Sensitivität von 0.64 und einer Spezifität von 0.83.

Beide Variablen sagen die Diagnose einer AD unabhängig voneinander voraus (logistische Regression). Ein Regressionsmodell, welches den Durchmesser von Histamin-induzierten Flare-Reaktionen erfasst, sagt die korrekte Diagnose einer AD in 70% der Fälle voraus und erklärt 36% der Varianz (Nagelkerke $R^2 = 0.358$, $P < 0.001$). Ein Regressionsmodell, welches die Cowhage-induzierte Juckreizpersistenz beinhaltet, erlaubt die korrekte Diagnose einer AD in 75% der Fälle und erklärt 31% der Varianz (Nagelkerke $R^2 = 0.313$, $P < 0.01$). Ein Regressionsmodell mit beiden Variablen ermöglicht die Diagnose einer AD in 80% der Fälle und erklärt 52% der Varianz (Nagelkerke $R^2 = 0.523$, $P < 0.001$).

Die ROC Analyse zeigte, dass die Kombination vom Durchmesser der Histamin-induzierten Flare-Reaktion und der Persistenz von Cowhage-induziertem Juckreiz noch bessere diagnostische Eigenschaften im Vergleich zu ihrer separaten Verwendung aufweist (Fläche unter der ROC-Kurve 0.87, 95% KI 0.746-0.989, $P < 0.001$). Die Sensitivität einer korrekten AD Diagnosestellung, wenn

zumindest ein Kriterium erfüllt wurde (d.h. Cowhage-induzierter Juckreiz länger als 30 Minuten oder Durchmesser von Histamin-induzierter Flare-Reaktion unter 20 mm), war 0.91 (Spezifität 0.67). Die Spezifität der korrekten AD Diagnose, wenn beide Kriterien erfüllt wurden, war 0.94 (Sensitivität 0.47).

In Subgruppen von AD Patienten, definiert durch die Flare-Reaktion (< 20 mm) oder Juckreizpersistenz nach Cowhage-Provokation (≥ 30 Minuten), waren weder Alter, SCORAD, SCORAD-Juckreizintensität, Diagnose von Asthma oder allergischer Rhinitis, noch das Geschlecht statistisch signifikant unterschiedlich.

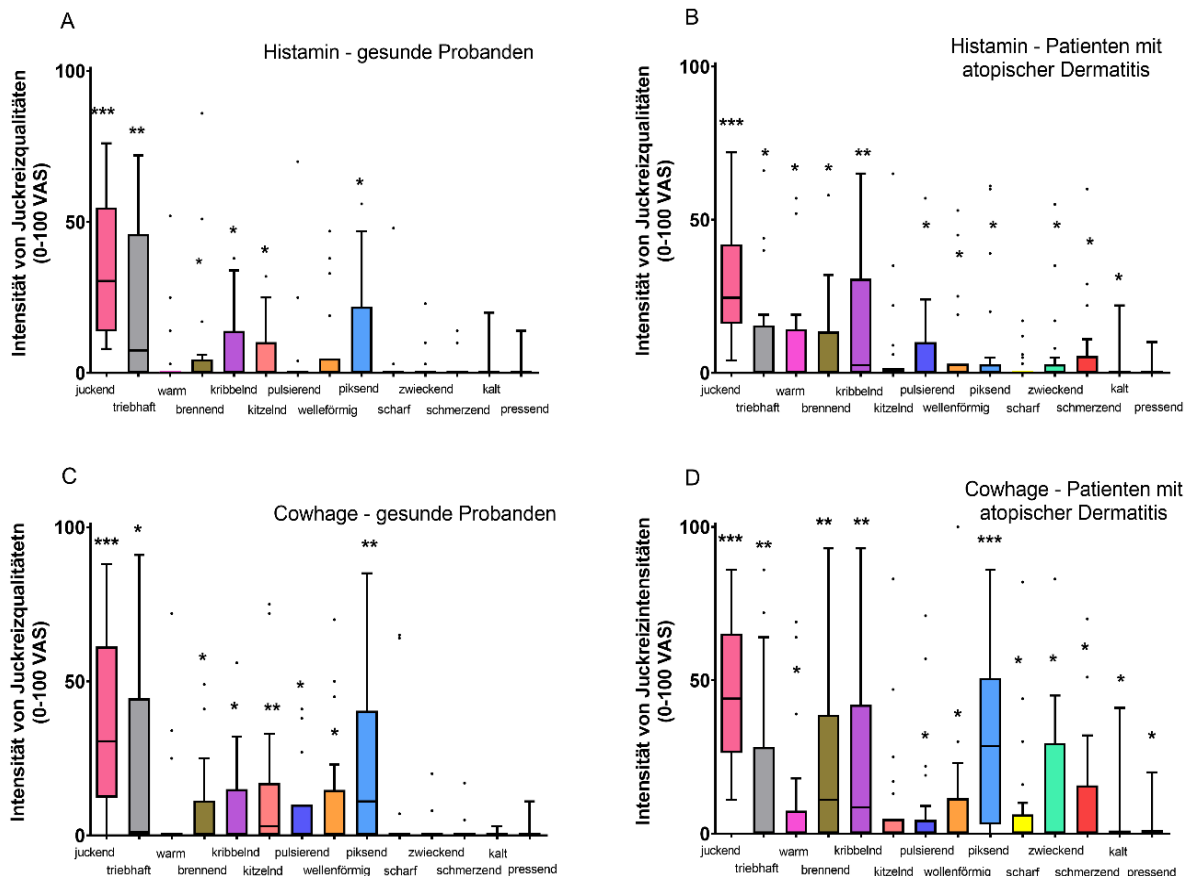


Abbildung 6. Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) berichten mehr Juckreiz-assoziierte Wahrnehmungen als gesunde Probanden nach Hautprovokationen mit Cowhage und Histamin. Boxplots repräsentieren den Interquartilsabstand, der Median ist mittels vertikaler Linie markiert, Whiskers repräsentieren die Spannweite. Ausreißer sind als Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) sind für Vergleiche mit Negativkontrolle angegeben (Wilcoxon's Test). (A) Skin Prick Test mit Histamin bei gesunden Probanden. (B) Skin Prick Test mit Histamin bei AD Patienten. (C) Hautprovokation mit Cowhage bei gesunden Probanden. (D) Hautprovokation mit Cowhage bei AD Patienten (aus Hawro et al. 2016 (50). Mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags).

Im Vergleich zu gesunden Probanden wählten Patienten mit AD mehr Juckreizqualitäten aus, sowohl hinsichtlich Histamin- als auch Cowhage-induziertem Juckreiz (Abbildung 6). Die Differenz in den Intensitäten der jeweiligen Juckreizqualitäten war zwischen beiden Gruppen nicht statistisch signifikant.

6. Diskussion

Die Ergebnisse des ersten Hauptexperiments zeigen, dass die Hautprovokationen mit Histamin, Capsaicin und Cowhage zu unterschiedlichen und einzigartigen Reaktionen hinsichtlich Juckreizdauer,

Juckreizintensität und der begleitenden Empfindungen als auch zu unterschiedlichen Flare-Reaktionen führen.

Eine Herausforderung für diese Arbeit stellte das Fehlen standardisierter Modelle für Capsaicin-induzierten Juckreiz dar. Im Verlauf von Pilotexperimenten wurde die optimale Konzentration von Capsaicin bestimmt, die, wenn mittels SPT appliziert, konsistenten Juckreiz auslöst. Der SPT eignet sich besonders gut als Applikationsverfahren für experimentelle Juckreizmodelle. Er ist einfach durchzuführen, sicher und ohne Risiko einer Kontamination des Ergebnisses durch Restaktivität unvollständig deaktivierter Cowhage Härchen. Der SPT mit 8% Capsaicin löste reproduzierbaren Juckreiz mit vergleichbarem Zeitverlauf zu Histamin und Cowhage aus.

Der Histamin-induzierte Juckreiz dauerte länger als Cowhage-induzierter Juckreiz, was mit neurophysiologischen Beobachtungen in Makaken kongruent ist. Diese zeigten, dass die durchschnittliche Dauer der Entladung von mit Cowhage stimulierten Neuronen kürzer war, als von mit Histamin stimulierten Neuronen (51).

Des Weiteren wurden Unterschiede in Profilen der begleitenden, mit Juckreiz assoziierten Empfindungen beobachtet. Capsaicin induzierte weniger intensive Empfindungen von „juckend“ und „triebhaft“ als Histamin und Cowhage. Histamin erzeugte weniger intensive Empfindungen von „brennend“ im Vergleich zu Capsaicin und Cowhage. Cowhage hingegen induzierte stärkere Empfindungen von „piksend“ als Histamin. Diese Ergebnisse widersprechen den früheren Ergebnissen von Sikand et al. (31). Die Diskrepanz kann aus verschiedenen Applikationsmethoden resultieren (SPT vs. Applikation mit inaktivierten und mit Histamin und Capsaicin durchdrungenen Cowhage Fasern). Der Einsatz einzelner Cowhage Fasern führt zu einer gezielteren Deposition von kleinen Mengen des Pruritogens. In unserem Experiment wurde mehr Substanz deponiert und damit wurden mehr Nervenfasern aktiviert. Darüber hinaus verwendeten Sikand et al. nur 3 sensorische Deskriptoren („juckend“, „piksend“/„stechend“ und „brennend“), was dazu führen könnte, dass mehr Qualitäten zu einem Deskriptor zugeordnet wurden. Das Setting unseres Experiments kann nicht die Frage beantworten, warum sich die Juckreizqualitäten zwischen Juckreizinduktoren unterscheiden. Es wurde berichtet, dass die Subgruppen von CMH und CMi Fasern auf verschiedene Mediatoren, Histamin und Capsaicin einschließlich, mit differenzierten Antwortmustern reagieren (52). Außerdem wurden unterschiedliche, jedoch überlappende, Gehirnaktivierungsnetzwerke für spezifische Sensationen identifiziert, die durch Capsaicin, Histamin und Cowhage aktiviert wurden. Für Capsaicin-induzierte brennende Empfindungen wurde ein spezifisches Netzwerk gefunden (53). TRPV1 kann, außer durch Capsaicin, durch Temperatur über 42 °C und pH Änderungen aktiviert werden. Die Induktion brennender Empfindungen gehört möglicherweise zur physiologischen Rolle von TRPV1, als Warnung vor Hitze und chemischer Verbrennung (29).

Es gibt wenige Studien in denen „ein Profil“ verschiedener Juckreizqualitäten bestimmten Krankheitsbildern zugeordnet wurde (33, 34). So beschrieben Patienten mit AD ihre Juckreizempfindung öfter als „stechend“ und „zwickend“ im Vergleich zu Patienten mit Psoriasis, Urtikaria, Scabies und nicht-atopischen Ekzemen (33). Bei AD scheint Juckreiz eine stärker ausgeprägte Lust- und Triebkomponente zu haben, als bei Urtikaria-, Kontaktdermatitis-, Prurigo- und Dialyse-Patienten (34). Es ist notwendig Juckreiz-begleitende sensorische Empfindungen in verschiedenen Erkrankungen weiter zu erforschen. Die Charakterisierung der Antwortprofile auf die Hautprovokationen kann dabei helfen, die experimentellen Juckreizmodelle als Modelle klinischer Pruritus-Formen zu etablieren und bei der Entwicklung von gezielteren anti-pruritischen Therapien zu unterstützen.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen der Flare-Reaktion und Juckreiz in drei experimentellen Juckreizmodellen untersucht. Nur im Histamin-vermittelten Juckreizmodell gab es eine Korrelation zwischen der Flare-Reaktion und Juckreiz. Dieser Zusammenhang war am besten mit der LSCI Messung vom Hautblutfluss ermittelbar. Er war jedoch ebenfalls evident, wenn die Flare-Reaktion mithilfe digitaler Planimetrie bestimmt wurde. Sowohl Flare-Reaktion als auch Juckreiz induziert durch Histamin werden durch Histamin-sensitive CMi Fasern vermittelt (15). Dass die Fläche des Histamin-induzierten erhöhten Blutflusses, aber nicht seine Intensität, mit dem Juckreiz korreliert impliziert, dass die Flare-Reaktionsfläche und der Juckreiz das Aktivierungsniveau gleicher Nervenfasern widerspiegeln. Die Ergebnisse sind kongruent mit früheren Berichten über Korrelation zwischen Juckreiz und mittels Laser Doppler Imager (LDI) als auch LSCI gemessenen Flare-Reaktionsflächen (38, 39). Eine Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Flare-Intensität und Juckreiz ist bisher nicht bekannt.

Messungen der Flare-Reaktion wurden bereits als Test der CMi-Faserfunktion vorgeschlagen und bei der Beurteilung der Small-Fiber Neuropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus validiert (40). Die Funktionsstörung von CMi Fasern bei Patienten mit Small-Fiber Neuropathie nach Iontophorese mit Histamin, war mit reduzierter Flare-Reaktionsfläche, aber nicht Intensität verbunden (54). Die hier vorgelegten Ergebnisse sind im Einklang mit diesen Berichten und implizieren, dass die Flare-Reaktionsfläche ein sensitiverer Parameter der Nervenfasernfunktion als die Flare-Intensität ist (54). Die Fläche der Flare-Reaktion ist direkt von der Größe, der funktionalen Integrität der axonalen Verzweigungen und der Nervenfaserdichte abhängig (55). Die Flare-Intensität hängt dagegen von der Reaktivität der glatten Gefäßmuskulatur und von der Verteilung und Degradierung von Vasodilatoren wie z.B. Calcitonin Gene Related Peptid (CGRP) ab (55). Zusammengefasst deuten die hier präsentierten Ergebnisse darauf hin, dass die Flare-Reaktionsfläche als Ersatz für subjektive Juckreizmessungen in experimentellen Modellen mit Histamin-anhängigem Juckreiz verwendet werden kann. Die Bewertung von Juckreiz auf einer VAS ist schneller und einfacher als der Einsatz fortgeschrittener Technik wie der LSCI. Es gibt jedoch Anwendungsbereiche, wo aufgrund von Einschränkungen subjektiver Juckreizmessungen (kleine Kinder, Probanden mit kognitiven Defiziten, in experimentellen Settings mit hohem subjektiven Bias oder Aufmerksamkeitsablenkung oder in Tierversuchen), die Flare-Reaktionsfläche die Juckreizbeurteilung ergänzen oder ersetzen könnte.

Capsaicin-induzierter Juckreiz hat mit Flare-Reaktionsparametern nicht korreliert, was sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie deckt (31). Die Transmission von Capsaicin-induziertem Juckreiz ist noch nicht ausreichend untersucht. TRPV1 ist auf sensorischen Neuronen weit exprimiert, was impliziert, dass viele Gruppen von Nervenfasern in der Weiterleitung von Capsaicin-induziertem Juckreiz involviert sein können. Es wurde bereits gezeigt, dass Capsaicin CMH, AMH und CMi Fasern aktiviert (52, 56, 57), einschließlich einer Subpopulation von „stillen“ Nozizeptoren, die erst nach einer Sensibilisierung auf Hitze oder mechanische Stimuli antworten. Ein Teil dieser Nervenfasern kann in der Juckreizweiterleitung und der Entstehung von Flare-Reaktionen teilnehmen (15, 37). Die mögliche Beteiligung von vielen Gruppen von Nervenfasern in der Juckreizweiterleitung könnte das Fehlen der Korrelation zwischen Capsaicin-induzierter Flare-Reaktion und Juckreiz erklären.

CMi Nervenfasern haben durch reichliche Verzweigungen die größten rezeptiven Felder, weshalb ihre Aktivierung am wahrscheinlichsten die Größe von Histamin- und Capsaicin-induzierter Flare-Reaktion bestimmt (15). Eine mikroneurographische Studie mit Capsaicin, appliziert durch intradermale Injektion, zeigte, dass diese Nervenfasern durch Capsaicin schwächer als durch Histamin aktiviert wurden (52). Folglich kann die schwächere Aktivierung von CMi Fasern durch Capsaicin (als durch Histamin) in kleineren Flare-Reaktionen resultieren, was unsere Beobachtung erklären könnte und was mit

früheren Beobachtungen übereinstimmt (17, 31). Eine andere Erklärung für größere Flare-Reaktionen nach SPT mit Histamin kann die bessere Hautdiffusion von Histamin sein. Dadurch werden mehr Nervenfasern als mit Capsaicin erreicht. Ein direkter Vergleich der Diffusion und Bioverfügbarkeit von Histamin und Capsaicin fehlen jedoch bislang.

Die Hautprovokation mit Cowhage löst einen starken Juckreiz ohne klassische Flare-Reaktion aus (12). Die Flare-Reaktion wurde in der hier vorgelegten Arbeit mittels LSCI erfasst und war deutlich kleiner als nach Histamin und Capsaicin. Cowhage aktiviert CMH und AMH Fasern (19), aber nicht CMi Fasern (20). CMH Fasern haben ca. dreifach kleinere receptive Felder im Vergleich zu CMi (58). Es wurde auch gezeigt, dass elektrische Stimulation von CMH Fasern, im Vergleich zur Stimulation von CMi Fasern, nur zu einem kurzen Blutflussanstieg in sehr begrenzten Arealen führt (37). Dies könnte erklären, warum die durch Cowhage hervorgerufenen Veränderungen des Blutflusses mit der Juckreizintensität nicht korrelieren.

Die Fläche der Histamin-induzierten Flare-Reaktion gemessen mittels digitaler Planimetrie korrelierte ebenfalls mit Juckreizparametern. Dieser Zusammenhang war jedoch schwächer als der Zusammenhang zwischen der Fläche des erhöhten Blutflusses gemessen mit LSCI und dem Juckreiz (AUC). Frühere Studien, in denen die Flare-Reaktion mit einem Lineal gemessen wurde, zeigen widersprüchliche Resultate mit keiner (17), schwacher (31) und moderater Korrelation (16) zwischen Flare-Reaktion und Juckreiz. Die LSCI scheint den Zusammenhang zwischen Flare-Reaktion und Juckreiz besser zu reflektieren als die planimetrische Morphometrie, was die Inkonsistenz von früheren Berichten erklären könnte.

Die Ergebnisse von Publikation 3 deuten darauf hin, dass die Unterschiede in der Histamin-induzierten Flare-Reaktion und in der Juckreizempfindung nach Hautprovokation mit Cowhage dabei helfen können, Patienten mit AD von gesunden Probanden zu unterscheiden.

Die Beobachtung, dass Histamin-induzierte Flare-Reaktionen in Patienten mit AD kleiner sind als in gesunden Probanden, stimmt mit früheren Berichten in der Literatur überein (44). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass AD Patienten kleinere Flare-Reaktionen nach Provokationen mit Neuropeptiden wie Substanz P, Neurokinin A oder CGRP entwickeln (44). Der Grund für diese veränderte Gefäßreaktion bei AD Patienten bleibt unklar. Die Toleranz und Tachyphylaxie gegenüber verschiedenen Mediatoren oder eine veränderte Gefäß-Reaktivität in atopischer Haut können mögliche Erklärungen sein.

Interessanterweise löste die Applikation von Cowhage auf läsionsfreier Haut bei Patienten mit AD Juckreiz aus, der wesentlich länger dauerte als bei gesunden Probanden. Dieser Befund bestätigt und erweitert die Beobachtung einer früheren Studie, welche zeigte, dass Cowhage-induzierter Juckreiz innerhalb einer 5,5-minütigen Beobachtungszeit bei AD Patienten langsamer nachlässt als bei gesunden Probanden (12). Es wurden hingegen keine Unterschiede zwischen AD Patienten und gesunden Probanden in der Dauer und der Intensität von Histamin-induziertem Juckreiz festgestellt, was in Übereinstimmung mit vorherigen Studien ist. Die Juckreizintensität nach Provokation mit Histamin auf läsionsfreier Haut war bei AD Patienten und gesunden Probanden vergleichbar (44), oder bei AD Betroffenen sogar reduziert im Vergleich zu gesunden Probanden (46) und zu Patienten mit Urtikaria und Psoriasis (45). Im Gegensatz dazu war der Histamin-induzierte Juckreiz, der in der läsionalen Haut ausgelöst wurde, bei AD Patienten stärker (46). Warum AD Patienten Cowhage-induzierten Juckreiz und nicht Histamin-induzierten Juckreiz anders als gesunde Probanden empfinden, ist bisher unbekannt. Eine mögliche Erklärung könnte eine selektive Sensibilisierung gegenüber dem PAR-2 vermittelten Juckreizsignalweg bei AD Patienten sein. Es wurde berichtet, dass PAR-2 nicht nur in läsionaler, sondern auch in läsionsfreier Haut von AD Patienten überexprimiert ist (22). Darüber hinaus empfinden

AD Patienten nach einer intradermalen Injektion von PAR-2-Agonisten einen stärkeren Juckreiz als gesunde Probanden (22). Die einzelnen AD Patienten zeigten nach Provokation mit Cowhage eine unterschiedliche Prurituspersistenz. Es ist möglich, dass sich die scheinbar gesunde Haut von AD Patienten in der PAR-2 Expression unterscheidet. Allerdings wurde kein klinisches Korrelat von Juckreizpersistenz, einschließlich AD Schweregrad, gefunden.

Eine veränderte Reaktivität von läsionsfreier Haut der AD Patienten kann auch andere, von PAR-2-Überexpression unabhängige Ursachen haben. Läsionsfreie, normal aussehende Haut von AD Patienten unterscheidet sich auf molekularer Ebene von gesunder Haut, was auf Veränderungen in terminaler Differenzierung und Expression inflammatorischer Gene zurückzuführen ist (59).

Diese Befunde können die Diagnose einer AD mit milden und/oder atypischen Hautmanifestationen unterstützen. Die Juckreizpersistenz nach Provokation mit Cowhage über mindestens 30 Minuten und Histamin-induzierte Flare-Reaktion unter 20 mm zeigten ein optimales Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität für diagnostische Zwecke. Darüber hinaus ist die Erkenntnis erwähnenswert, dass sie mit der klinischen Schwere der AD Erkrankung nicht korrelieren. Dies impliziert, dass sie hilfreich sein können, wenn Hautmanifestationen klein sind oder sogar fehlen. Ein SPT mit Histamin wird routinemäßig, als Teil eines größeren diagnostischen Prozesses bei Verdacht auf AD, allergische Rhinokonjunktivitis oder allergisches Asthma durchgeführt. Cowhagehärschen lassen sich auf einfache Art und Weise applizieren, sind sicher und preiswert, und wenn sie richtig aufbewahrt werden, behalten sie ihre Eigenschaften für längere Zeit. Das alles spricht dafür, dass sie in diagnostische Verfahren unkompliziert eingeschlossen werden können.

Es gab keine Unterschiede zwischen AD Patienten und gesunden Probanden in Bezug auf die Intensität von einzelnen Juckreizqualitäten nach Hautprovokationen mit Histamin oder Cowhage. Keine einzige Juckreizqualität ermöglichte eine Differenzierung zwischen Patienten mit AD und Gesunden. Patienten mit AD berichteten jedoch über eine höhere Anzahl von wahrgenommenen Empfindungen als gesunde Probanden. Bisher wurde der Vergleich von Juckreizqualitäten zwischen Patienten mit AD und anderen Dermatosen und gesunden Probanden in experimentellen Juckreizmodellen nicht untersucht. Eine höhergradige Mehrdimensionalität der Juckreizempfindung von AD Patienten könnte durch Unterschiede im zentralen Juckreizverarbeiten zwischen AD Patienten und gesunden Probanden erklärt werden. So wurde gezeigt, dass Patienten mit AD, nach Iontophorese mit Histamin auf läsionsfreier Haut, mehr aktivierte Gehirnstellen auf PET-Scans aufweisen als gesunde Probanden (60).

7. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden drei experimentelle Juckreizmodelle, SPT mit Histamin, SPT mit Capsaicin und Hautprovokation mit Cowhage, untersucht und eingesetzt. Daneben werden Anwendungsmöglichkeiten in experimentellen Bedingungen und klinischer Praxis aufgezeigt.

Die Ergebnisse der ersten Publikation zeigen Unterschiede in induziertem Juckreiz, sensorischen Qualitäten und Hautreaktionen in drei experimentellen Juckreizmodellen. Die Charakterisierung der Profile von Juckreizqualitäten kann zum besseren Verständnis der Beteiligung unterschiedlicher Mediatoren und Juckreizwege in Krankheitsbildern, die mit chronischem Pruritus einhergehen, beitragen. Des Weiteren wurde der SPT mit 8% Capsaicin als ein experimentelles Pruritusmodell in gesunden Probanden validiert. In Publikation 2 wurde ebenfalls gezeigt, dass in Histamin-abhängigen Pruritusmodellen Juckreiz und Fläche der Flare-Reaktion verknüpft sind. Dies impliziert, dass sie das Aktivierungsniveau von gleichen CMi Fasern widerspiegeln. Diese Korrelation ist am deutlichsten, wenn die Flare-Reaktion mittels LSCI erfasst wird. Die mittels LSCI gemessene Fläche erhöhten Blutflusses könnte damit in experimentellen Settings als Ergänzung der subjektiven Juckreizbewertung

Verwendung finden. Abschließend deuten die Ergebnisse der dritten Publikation darauf hin, dass die verminderte Flare-Reaktion im Rahmen einer SPT mit Histamin (<20 mm) und die verlängerte Juckreizpersistenz nach Hautprovokation mit Cowhage (>30 Minuten) als diagnostische Marker einer AD genutzt werden können. Beide Verfahren sind sicher, kostengünstig, einfach zu durchführen und können die richtige Diagnosestellung unterstützen, auch wenn typische Hautmanifestationen der AD fehlen.

8. Referenzen

1. Weisshaar E, Szepietowski JC, Dalgard FJ, Garcovich S, Gieler U, Giménez-Arnau AM, Lambert J, Leslie T, Mettang T, Misery L, Şavk E, Streit M, Tschachler E, Wallengren J, Ständer S. European S2k Guideline on Chronic Pruritus. *Acta Derm Venereol.* 2019;99(5):469-506.
2. Hawro T, Przybyłowicz K, Spindler M, Hawro M, Steć M, Altrichter S, Weller K, Magerl M, Reidel U, Alarbeed E, Alraboni O, Maurer M, Metz M. The characteristics and impact of pruritus in adult dermatologic patients: A prospective, cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol.* 2020.
3. Yosipovitch G. Assessment of pruritus in atopic dermatitis: validation of the Severity of Pruritus Scale (SPS). In: Simpson EL, editor. *Itch2018.* p. p e13.
4. Szepietowski JC, Reich A. Pruritus in psoriasis: An update. *Eur J Pain.* 2016;20(1):41-6.
5. Jankowska-Konsur A, Reich A, Szepietowski J, Group PCUW. Clinical characteristics and epidemiology of chronic urticaria: a nationwide, multicentre study on 1091 patients. *Postepy Dermatol Alergol.* 2019;36(2):184-91.
6. Yosipovitch G, Ansari N, Goon A, Chan YH, Goh CL. Clinical characteristics of pruritus in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol.* 2002;147(1):32-6.
7. Yosipovitch G, Goon AT, Wee J, Chan YH, Zucker I, Goh CL. Itch characteristics in Chinese patients with atopic dermatitis using a new questionnaire for the assessment of pruritus. *Int J Dermatol.* 2002;41(4):212-6.
8. Yosipovitch G, Goon A, Wee J, Chan YH, Goh CL. The prevalence and clinical characteristics of pruritus among patients with extensive psoriasis. *Br J Dermatol.* 2000;143(5):969-73.
9. Darsow U, Scharein E, Simon D, Walter G, Bromm B, Ring J. New aspects of itch pathophysiology: component analysis of atopic itch using the 'Eppendorf Itch Questionnaire'. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;124(1-3):326-31.
10. Pereira MP, Zeidler C, Storck M, Agelopoulos K, Philipp-Dormston WG, Zink A, Ständer S. Challenges in Clinical Research and Care in Pruritus. *Acta Derm Venereol.* 2020;100(2):adv00028.
11. Andersen HH, Elberling J, Arendt-Nielsen L. Human surrogate models of histaminergic and non-histaminergic itch. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(7):771-7.
12. Papoiu AD, Tey HL, Coghill RC, Wang H, Yosipovitch G. Cowhage-induced itch as an experimental model for pruritus. A comparative study with histamine-induced itch. *PLoS One.* 2011;6(3):e17786.
13. Ständer S, Weisshaar E, Steinhoff M, Lugner T, Metze D. Pruritus - Pathophysiologie, Klinik und Therapie - Eine Übersicht. *Journal of the German Society of Dermatology.* 2003;1(2):105-18.
14. Thurmond RL. The histamine H4 receptor: from orphan to the clinic. *Front Pharmacol.* 2015;6:65.
15. Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci.* 1997;17(20):8003-8.
16. Darsow U, Ring J, Scharein E, Bromm B. Correlations between histamine-induced wheal, flare and itch. *Arch Dermatol Res.* 1996;288(8):436-41.
17. Sikand P, Shimada SG, Green BG, LaMotte RH. Sensory responses to injection and punctate application of capsaicin and histamine to the skin. *Pain.* 2011;152(11):2485-94.

18. Darsow U, Scharein E, Bromm B, Ring J. Skin testing of the pruritogenic activity of histamine and cytokines (interleukin-2 and tumour necrosis factor-alpha) at the dermal-epidermal junction. *Br J Dermatol.* 1997;137(3):415-7.
19. Ringkamp M, Schepers RJ, Shimada SG, Johanek LM, Hartke TV, Borzan J, Shim B, LaMotte RH, Meyer RA. A role for nociceptive, myelinated nerve fibers in itch sensation. *J Neurosci.* 2011;31(42):14841-9.
20. Namer B, Carr R, Johanek LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M. Separate peripheral pathways for pruritus in man. *J Neurophysiol.* 2008;100(4):2062-9.
21. Reddy VB, Iuga AO, Shimada SG, LaMotte RH, Lerner EA. Cowhage-evoked itch is mediated by a novel cysteine protease: a ligand of protease-activated receptors. *J Neurosci.* 2008;28(17):4331-5.
22. Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, Luger TA, Schmelz M. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci.* 2003;23(15):6176-80.
23. Imamachi N, Park GH, Lee H, Anderson DJ, Simon MI, Basbaum AI, Han SK. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(27):11330-5.
24. Patel KN, Liu Q, Meeker S, Udem BJ, Dong X. Pirt, a TRPV1 modulator, is required for histamine-dependent and -independent itch. *PLoS One.* 2011;6(5):e20559.
25. Nakagawa H, Hiura A. Four Possible Itching Pathways Related to the TRPV1 Channel, Histamine, PAR-2 and Serotonin. *Malays J Med Sci.* 2013;20(4):5-12.
26. Yun JW, Seo JA, Jang WH, Koh HJ, Bae IH, Park YH, Lim KM. Antipruritic effects of TRPV1 antagonist in murine atopic dermatitis and itching models. *J Invest Dermatol.* 2011;131(7):1576-9.
27. Yun JW, Seo JA, Jeong YS, Bae IH, Jang WH, Lee J, Kim SY, Shin SS, Woo BY, Lee KW, Lim KM, Park YH. TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery. *J Dermatol Sci.* 2011;62(1):8-15.
28. Bonchak JG, Swerlick RA. Emerging therapies for atopic dermatitis: TRPV1 antagonists. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78(3 Suppl 1):S63-S6.
29. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816-24.
30. LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EF. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol.* 1991;66(1):190-211.
31. Sikand P, Shimada SG, Green BG, LaMotte RH. Similar itch and nociceptive sensations evoked by punctate cutaneous application of capsaicin, histamine and cowhage. *Pain.* 2009;144(1-2):66-75.
32. Green BG, Shaffer GS. The sensory response to capsaicin during repeated topical exposures: differential effects on sensations of itching and pungency. *Pain.* 1993;53(3):323-34.
33. Brenaut E, Garlantezec R, Talour K, Misery L. Itch characteristics in five dermatoses: non-atopic eczema, atopic dermatitis, urticaria, psoriasis and scabies. *Acta Derm Venereol.* 2013;93(5):573-4.
34. Droge U, Mautner V, Hoting E. Differenzierung von Pruritusqualitäten. *Dtsch Derm.* 1986;34:919-32.
35. Weisshaar E, Gieler U, Kupfer J, Furue M, Saeki H, Yosipovitch G, Itch IFotSo. Questionnaires to assess chronic itch: a consensus paper of the special interest group of the International Forum on the Study of Itch. *Acta Derm Venereol.* 2012;92(5):493-6.
36. Izumi H, Karita K. Investigation of mechanisms of the flare and wheal reactions in human skin by band method. *Brain Res.* 1988;449(1-2):328-31.
37. Schmelz M, Michael K, Weidner C, Schmidt R, Torebjörk HE, Handwerker HO. Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin? *Neuroreport.* 2000;11(3):645-8.

38. Andersen HH, Elberling J, Lo Vecchio S, Arendt-Nielsen L. Topography of itch: evidence of distinct coding for pruriception in the trigeminal nerve. *Itch (Phila)*. 2017;2(1):e2.
39. Johaneck LM, Meyer RA, Hartke T, Hobelmann JG, Maine DN, LaMotte RH, Ringkamp M. Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch. *J Neurosci*. 2007;27(28):7490-7.
40. Caselli A, Spallone V, Marfia GA, Battista C, Pachatz C, Veves A, Uccioli L. Validation of the nerve axon reflex for the assessment of small nerve fibre dysfunction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(8):927-32.
41. Deckers IA, McLean S, Linssen S, Mommers M, van Schayck CP, Sheikh A. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. *PLoS One*. 2012;7(7):e39803.
42. Werfel T, Heratizadeh A, Aberer W, Ahrens F, Augustin M, Biedermann T, Diepgen T, Fölster-Holst R, Gieler U, Kahle J, Kapp A, Nast A, Nemat K, Ott H, Przybilla B, Roewen M, Schlaeger M, Schmid-Grendelmeier P, Schmitt J, Schwennesen T, Staab D, Worm M. S2k guideline on diagnosis and treatment of atopic dermatitis - short version. *Allergo J Int*. 2016;25:82-95.
43. Thijs JL, van Seggelen W, Bruijnzeel-Koomen C, de Bruin-Weller M, Hijnen D. New Developments in Biomarkers for Atopic Dermatitis. *J Clin Med*. 2015;4(3):479-87.
44. Giannetti A, Girolomoni G. Skin reactivity to neuropeptides in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1989;121(6):681-8.
45. Heyer G, Koppert W, Martus P, Handwerker HO. Histamine and cutaneous nociception: histamine-induced responses in patients with atopic eczema, psoriasis and urticaria. *Acta Derm Venereol*. 1998;78(2):123-6.
46. Ikoma A, Rukwied R, Ständer S, Steinhoff M, Miyachi Y, Schmelz M. Neuronal sensitization for histamine-induced itch in lesional skin of patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol*. 2003;139(11):1455-8.
47. Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(9):1755-61.
48. Darsow U, Mautner VF, Bromm B, Scharein E, Ring J. [The Eppendorf Pruritus Questionnaire]. *Hautarzt*. 1997;48(10):730-3.
49. Lehmann S, Deuring E, Weller K, Scheffel J, Metz M, Maurer M, Hawro T. Flare Size but Not Intensity Reflects Histamine-Induced Itch. *Skin Pharmacol Physiol*. 2020;33(5):244-52.
50. Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. *Allergy*. 2016;71(12):1745-52.
51. Davidson S, Zhang X, Yoon CH, Khasabov SG, Simone DA, Giesler GJ. The itch-producing agents histamine and cowhage activate separate populations of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci*. 2007;27(37):10007-14.
52. Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjork HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol*. 2003;89(5):2441-8.
53. Vierow V, Forster C, Vogelgsang R, Dörfler A, Handwerker HO. Cerebral Networks Linked to Itch-related Sensations Induced by Histamine and Capsaicin. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(6):645-52.
54. Bickel A, Krämer HH, Hilz MJ, Birklein F, Neundörfer B, Schmelz M. Assessment of the neurogenic flare reaction in small-fiber neuropathies. *Neurology*. 2002;59(6):917-9.
55. Geber C, Fondel R, Krämer HH, Rolke R, Treede RD, Sommer C, Birklein F. Psychophysics, flare, and neurosecretory function in human pain models: capsaicin versus electrically evoked pain. *J Pain*. 2007;8(6):503-14.

56. Wooten M, Weng HJ, Hartke TV, Borzan J, Klein AH, Turnquist B, Dong X, Meyer RA, Ringkamp M. Three functionally distinct classes of C-fibre nociceptors in primates. *Nat Commun.* 2014;5:4122.
57. Baumann TK, Simone DA, Shain CN, LaMotte RH. Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *J Neurophysiol.* 1991;66(1):212-27.
58. Schmidt R, Schmelz M, Weidner C, Handwerker HO, Torebjörk HE. Innervation territories of mechano-insensitive C nociceptors in human skin. *J Neurophysiol.* 2002;88(4):1859-66.
59. Suárez-Fariñas M, Tintle SJ, Shemer A, Chiricozzi A, Nograles K, Cardinale I, Duan S, Bowcock AM, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(4):954-64.e1-4.
60. Schneider G, Ständer S, Burgmer M, Driesch G, Heuft G, Weckesser M. Significant differences in central imaging of histamine-induced itch between atopic dermatitis and healthy subjects. *Eur J Pain.* 2008;12(7):834-41.

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sylwia Lehmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Untersuchung experimenteller Pruritusmodelle: Neue Anwendungsmöglichkeiten von Hautprovokationstests mit Histamin, Cowhage (Mucuna pruriens) und Capsaicin [Study on experimental models of itch: new applications of skin provocations tests with histamine, cowhage (Mucuna pruriens) and capsaicin]* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10. Anteilserklärung Publikationen

Frau Sylwia Lehmann hatte folgenden Anteil an den Publikationen:

Publikation 1: *Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61*

Beitrag im Einzelnen:

1. Konzipierung der Pilotexperimente in Zusammenarbeit mit Dr. med. T. Hawro.
2. Rekrutierung von Probanden, praktische Durchführung der Provokationstestungen, Dokumentation und Analyse der Daten von Pilotexperimenten als auch die Erstellung von zusätzlichen Tabellen (*Table 1, 2*).
3. Beteiligung an der statistischen Analyse: Auswertung der Daten zur Graphik (*Fig.4*) und Erstellung von zusätzlichen Tabellen (*Table 3, 4, 5*).
4. Literaturrecherche in Zusammenarbeit mit Dr. med. T. Hawro, insbesondere Recherche und Aufbereitung des aktuellen Forschungsstands zu den durch Hautprovokationen mit Capsaicin, Histamin und Cowhage induzierten Empfindungen, beteiligten Nervenfasern, Funktionen und Interaktionen von TRPV1, H1R, H4R, PAR2 und PAR4.
5. Interpretation der Ergebnisse und kritische Revision des Manuskripts.

Publikation 2: *Lehmann S, Deuring E, Weller K, Scheffel J, Metz M, Maurer M, Hawro T. Flare Size but not Intensity reflects histamine-induced itch. Skin Pharmacol Physiol. 2020;33(5):244-52.*

Beitrag im Einzelnen:

1. Durchführung der statistischen Analyse in Zusammenarbeit mit Dr. med. T. Hawro.
2. Interpretation der Ergebnisse mit den Ko-Autoren.
3. Erstellung von Graphiken (*Fig. 1b, Fig. 2*) und Tabellen (*Table1, Table 2*).
4. Ausführliche Literaturrecherche.
5. Federführende Manuskripterstellung in Zusammenarbeit mit Dr. med. T. Hawro und Prof. Dr. med. M. Maurer (*Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion*).
6. Kritische Revision des Manuskripts in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren (Überprüfung des erstellten Manuskripts und Einarbeitung der Kommentare der Ko-Autoren vor Einreichung).
7. Einarbeitung der Reviewerkommentare in das finale Manuskript in Zusammenarbeit mit Dr. med. T. Hawro im Rahmen des Reviewprozesses nach Einreichung des Manuskripts.

Publikation 3: *Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.*

Beitrag im Einzelnen:

1. Datenerhebung (Rekrutierung der Probanden und Patienten, Durchführung der Hautprovokationen und Dokumentation als auch systematische Aufbereitung der Daten).
2. Beteiligung an der Erstellung der Graphiken (*Fig. 4, Fig. 5*).
3. Ausführliche Literaturrecherche und deren Bereitstellung zur Verfassung des Manuskripts.
4. Beteiligung an der Überprüfung und Korrektur der ersten Manuskriptversion (kritische Revision).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers / der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin / des Doktoranden

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(9):1755-61.

<https://doi.org/10.1111/jdv.15743>

Flare Size but Not Intensity Reflects Histamine-Induced Itch

Sylwia Lehmann Elyne Deuring Karsten Weller Jörg Scheffel Martin Metz
Marcus Maurer Tomasz Hawro

Dermatological Allergology, Allergie-Centrum-Charité, Department of Dermatology and Allergy, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

Keywords

Axon reflex flare · Capsaicin · Cowhage · Histamine · Itch · Pruritus

Abstract

Introduction: Flare reactions arise due to the release of vasodilators from sensory nerves caused by antidromic transmission of action potentials after the induction of itch. **Objective:** We investigated the link between flare and itch using 3 models of itch. **Methods:** Skin provocations with histamine, capsaicin, and cowhage were performed in 31 subjects. Itch was quantified using the visual analog scale. Flare was assessed using laser speckle contrast imaging (LSCI) and digital photography. **Results:** The duration, intensity, and area under the curve of histamine-induced itch correlated with the area of increased blood flow measured with LSCI ($r = 0.545$, $p = 0.002$; $r = 0.575$, $p = 0.001$; and $r = 0.649$, $p < 0.001$, respectively). Itch and skin blood flow in response to capsaicin or cowhage did not correlate. **Conclusion:** In histamine-induced skin inflammation, itch and increased blood flow are linked. Thus, the area of histamine-induced flare may be used as a surrogate marker for histamine-induced itch.

© 2020 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Skin flare reaction, that is, visible skin redness reflecting arteriolar dilation, involves vasodilators that are released by cutaneous sensory nerves due to their antidromic stimulation during responses to noxious stimuli [1]. This neuronal mechanism behind the flare reaction is also called the axon reflex. At the same time, local activation of sensory skin nerves and the subsequent orthodromic transmission of action potentials result in the transmission of sensory information, including itch, to the brain [2, 3]. Considering this involvement of skin sensory nerves in both, the flare and the itch that come with skin inflammatory responses, it is conceivable that flare size and itch intensity are linked, reflecting the level of activation of sensory skin nerves.

Flare is a parameter that is readily available for objective evaluation and could be used to complement the assessment of itch intensity, which currently relies on its subjective estimation by patients. In recent years, new techniques for the assessment of skin flare responses have emerged, enabling more precise quantification of vasodilation than solely the visual assessment of skin redness. Today, flare reactions can be quantified in terms of their size and intensity, based on measurements

of skin blood flow, using laser Doppler imaging (LDI), laser speckle contrast imaging (LSCI), infrared thermography, or reflectance colorimetry [3–6]. Along with this, in vivo models of experimentally induced skin inflammation and itch became well-established research tools for the identification and characterization of the pathomechanisms of itch and for the development of new antipruritic drugs [5–8]. Skin provocations with histamine and cowhage spicules represent 2 well-established experimental models of itch [9]. Histamine induces skin inflammation and itch through the activation of histamine H1 and H4 receptors (H1R and H4R, respectively) [10, 11]. Mucunain, a protease contained in cowhage, activates protease-activated receptors 2 and 4 (PAR2 and PAR4, respectively) [12, 13]. Capsaicin, signaling through transient receptor potential vanilloid 1, is a well-known pain inducer upon intradermal injection [14, 15]. Its more superficial application by means of deactivated cowhage spicules has been shown to evoke itch [16, 17], and its application via skin prick testing (SPT) has recently been validated as a model for skin inflammation and itch [18].

As of now, there are only few studies on the relationship between experimentally induced flare and itch, and their outcomes are inconclusive or contradictory [16, 17]. Also, all of these studies are limited to the characterization of the area of flare reactions and did not analyze flare intensity, and most of them only assessed histamine-induced flare and itch [19, 20]. As of yet, only 1 study investigated the relationship between histamine-, cowhage-, and capsaicin-induced flare and itch [16]. Also, only 2 studies employed advanced methods, such as LDI and LSCI for the assessment of the changes in skin blood flow that underlie histamine- and cowhage-induced flare responses, to assess its links to itch [20, 21].

A better understanding of how flare responses and itch are linked, in addition to helping research efforts, may also be of clinical relevance. Objective and precise measurements of flare responses could help determine itch intensity in patients with pruritic skin diseases. Previously, a diminished flare area has been proposed and validated as a test for the functional impairment of C-fibers in small fiber neuropathy [22]. The aim of our study was to investigate the relationship between the flare responses induced by histamine, capsaicin, and cowhage and the itch that comes with them, using LSCI-based measurements of the area of increased blood flow and blood flow intensity combined with macroscopic planimetric assessment of the flare size.

Materials and Methods

Study Subjects and Conduct

The data on sensory qualities obtained in this experiment were published recently along with characteristics of the subjects and provocations [18]. Briefly, a total of 31 healthy volunteers (median age: 28 years, lower quartile 26, upper quartile 34 years; range: 20–38 years; 15 females) were included in the study. Ten subjects (6 females) had a positive history for allergic rhinitis or allergic asthma. They were completely symptom free during the course of the study. Antihistamines and analgesics were not allowed for 1 week before testing. Antidepressants and corticosteroids, both systemic and topical, were prohibited at least 14 days prior to the experiment. All participants were asked to refrain from coffee consumption at least 4 h before skin provocations on the day of the study.

Skin Challenges

The same examiner performed skin provocations in all subjects, 15 min after acclimatization, in an air-conditioned study room under constant temperature (22–26°C) and air humidity (40–60%). Skin prick tests with histamine (10 mg/mL; ALK-Abello, Horsholm, Denmark), capsaicin (0.08 g/mL capsaicin and 48% polysorbate 80 in isotonic saline solution; Charité Pharmacy, Berlin), and their negative controls (respectively, ALK-Abello, Horsholm, Denmark, and 48% polysorbate 80 in isotonic saline solution; Charité Pharmacy, Berlin) were performed on the volar forearm [18]. A total of 40–45 active cowhage spicules and its negative control (40–45 cowhage spicules deactivated by autoclaving) were rubbed gently for 45 s on the skin provocation area (400 mm²), as described previously [9]. For all skin challenges, the negative control for the active substance was applied on the opposite forearm. Skin challenges with individual active compounds and their controls were performed at least 60 min apart. Provocation sites were located at least 5 cm apart. The randomization included the order of the provocation substance, the side of the forearm (left-right), and the provocation site (proximal-distal).

Assessment of Itch

Itch intensity was assessed on a 100-mm visual analog scale (VAS) every minute up to 30 min. Itch duration, peak intensity, and area under the curve (AUC) were analyzed.

Assessment of the Area of Increased Blood Flow and the Intensity of Increased Blood Flow

LSCI was done before, 10, 20, 40, 60, and 90 min after skin provocation to assess the size of the skin area that exhibited increased blood flow and the intensity of increased blood flow. LSCI images were analyzed using dedicated software (full-field laser perfusion imager-2; moorFLPI2-Review V4.0; Moor Instruments, Axminster, UK). The principle of the measurements is described elsewhere [23]. We used a recording mode with a rate of 1 image per second. The area of increased blood flow (mm²) was defined as the skin area on post-provocation images with a blood flux exceeding the mean flux plus 2 SD (as calculated for each site before provocation). The maximal intensity of blood flow, that is, the maximal value of post-provocation blood flux, was measured within the predefined circular area of 415 mm² with its center in the provocation site and expressed in perfusion units. The mean value of blood flux (mean flare intensity) was measured within the area of increased blood flow and expressed in perfusion units.

Table 1. Changes in flare after skin provocations with histamine, capsaicin, and cowhage and their negative controls captured with different assessment methods

| Substance | Flare assessment method | Significance of differences related to the values before provocation | | | | | ANOVA, significance level | Significance level of differences in the AUC of flare between substances and their negative controls |
|-----------|--|--|--|--|--|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| | | flare parameters (mean±SEM); posttest significance level | | | | | | |
| | | before provocation | time after provocation | 20 min | 40 min | 60 min | | |
| Histamine | Digital planimetry (mm ²) | 0 | 413.045±46.236; p < 0.001 | 393.567±48.397; p < 0.001 | 286.124±49.034; p < 0.001 | 138.630±35.147; p = 0.007 | 17.47±9.882; p < 0.001 | p < 0.001 |
| | LSCI area of increased blood flow (mm ²) | 0 | 523.201±68.211; p < 0.001 | 317.845±50.152; p < 0.001 | 125.146±29.015; p = 0.002 | 30.797±8.849; p = 0.023 | 1.646±1.253; p = 1.000 | p < 0.001 |
| | LSCI maximal intensity of blood flow (PU) | 59.574±3.253 | 1241.0±70.809; p < 0.001 | 1112.74±80.411; p < 0.001 | 646.387±49.927; p < 0.001 | 447.516±29.487; p = 0.007 | 380.838±18.806; p = 0.141 | p < 0.001 |
| | LSCI mean intensity of blood flow (PU) | 0 | 220.977±9.300; p < 0.001 | 206.725±9.331; p < 0.001 | 150.287±14.983; p < 0.001 | 63.393±13.940; p = 0.001 | 10.338±7.211; p = 1.000 | p < 0.001 |
| | Digital planimetry (mm ²) | 0 | 96.024±24.668; p = 0.008 | 79.085±29.426; p = 0.174 | 28.995±12.003; p = 0.330 | 12.600±6.487; p = 0.923 | 1.865±0.551; p = 0.030 | p = 0.005 |
| Capsaicin | LSCI area of increased blood flow (mm ²) | 0 | 141.041±25.204; p < 0.001 | 53.714±9.413; p < 0.001 | 14.082±3.469; p = 0.005 | 2.107±1.136; p = 1.000 | 0 | p < 0.001 |
| | LSCI maximal intensity of blood flow (PU) | 283.709±9.750 | 668.451±41.392; p < 0.001 | 617.871±49.775; p < 0.001 | 452.645±33.188; p < 0.001 | 361.064±21.684; p = 0.052 | 314.516±14.934; p = 1.000 | p < 0.001 |
| | LSCI mean intensity of blood flow (PU) | 0 | 136.690±12.938; p < 0.001 | 120.551±13.578; p < 0.001 | 72.054±14.978; p = 0.001 | 18.980±9.321; p = 0.760 | 0 | p < 0.001 |
| | Digital planimetry (mm ²) ^a | - | - | - | - | - | - | - |
| | LSCI area of increased blood flow (mm ²) | 0 | 36.867±16.298; p = 0.255 | 18.774±8.226; p = 0.060 | 14.439±7.978; p = 1.000 | 2.419±1.701; p = 1.000 | 9.258±7.326; p = 1.000 | p = 0.052 |
| Cowhage | LSCI maximal intensity of blood flow (PU) | 306.741±11.874 | 428.290±47.802; p = 0.255 | 410.822±30.923; p = 0.060 | 342.500±24.875; p = 1.000 | 342.096±23.825; p = 1.000 | 343.483±20.168; p = 1.000 | p = 0.046 |
| | LSCI mean intensity of blood flow (PU) | 0 | 37.203±14.116; p = 0.198 | 29.512±12.408; p = 0.359 | 27.945±11.745; p = 0.359 | 8.638±6.043; p = 1.000 | 15.345±8.624; p = 1.000 | p = 0.044 |
| | Digital planimetry (mm ²) | - | - | - | - | - | - | p = 0.033 |

RM ANOVA was applied to test changes in flare parameters over time. Bonferroni-adjusted post hoc analysis was employed to test which measurements differed significantly from the initial values. Differences in overall flare reaction between the AUC of flare induced by active substances and their negative controls were tested with paired-sample *t* tests. Significant differences are marked in bold. AUC, area under the curve; LSCI, laser speckle contrast imaging; PU, perfusion units; RM, repeated measures; SEM, standard error of the mean. ^a Flare evoked by cowhage consisted in some patients of multiple micro-erythemic reactions. Due to their blurred demarcation, consistent planimetric assessment was not possible.

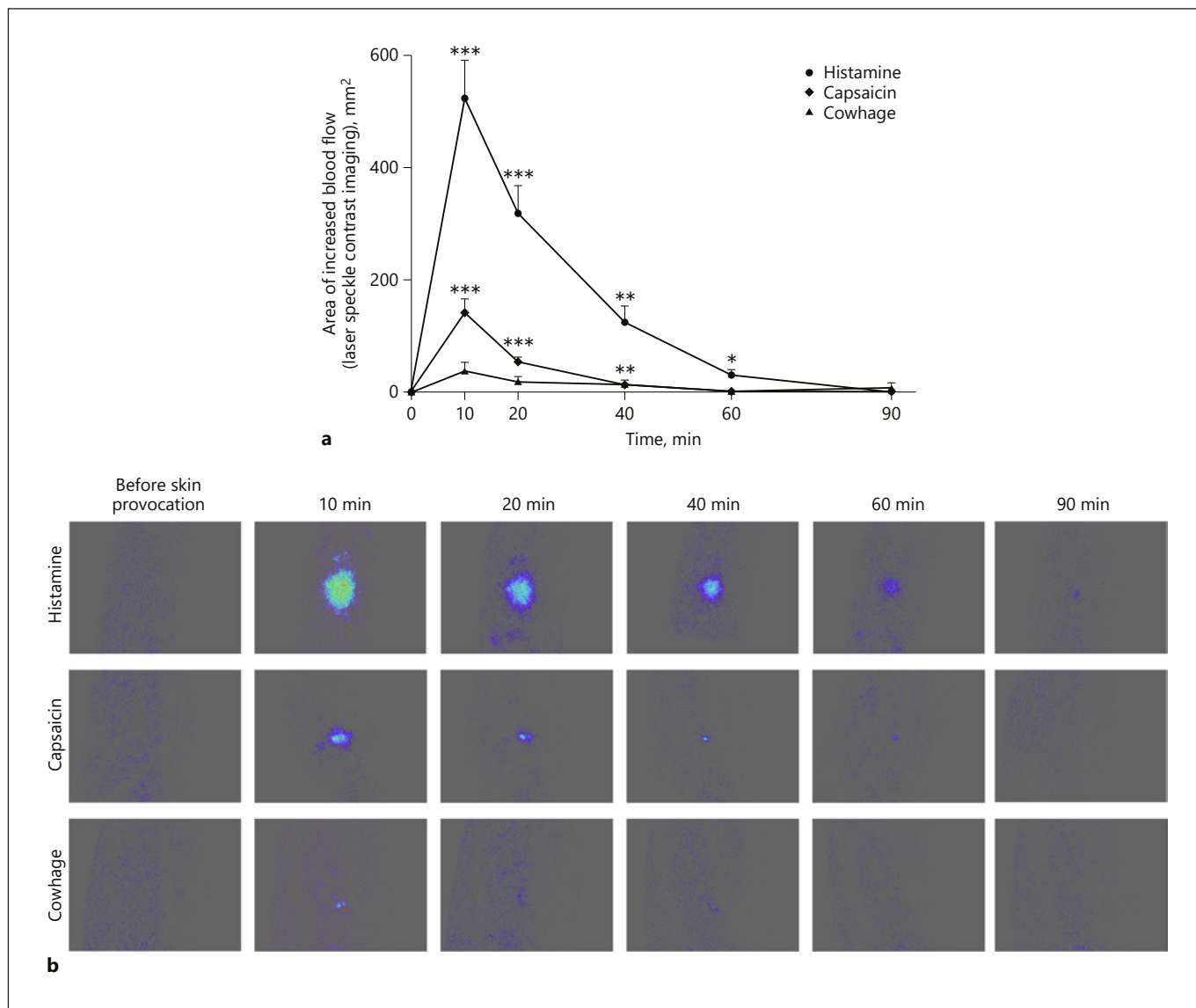


Fig. 1. Change in blood flow after experimental itch induction depends on the type of provocation. **a** Kinetic curves of increase in blood flow (mm²) to the baseline as assessed using LSCI over the whole 90-min observation period following skin provocations with histamine, capsaicin, and cowhage. Statistical significances (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001) are shown for comparisons between parameters before and after the skin challenge at each

measurement time-point for active substances (● – histamine, ◆ – capsaicin, ▲ – cowhage). Whiskers represent SEM. **b** Examples of flare development in time captured by LSCI after experimental itch induction with histamine, capsaicin, and cowhage. Subtraction of individual blood flux threshold (mean + 2 SD of blood flux on the pre-provocation site). LSCI, laser speckle contrast imaging; SEM, standard error of the mean.

Assessment of Flare

Skin imaging by digital photography was performed before, 10, 20, 40, 60, and 90 min after skin provocation. The area of the flare was determined by macroscopic quantitative planimetric morphometry from digital pictures with ImageJ software (ImageJ developers, NIH, MD, USA). The flare area was delineated manually on each picture and expressed in mm² [6].

Statistical Analyses

Continuous variables are presented as means ± standard error of the mean. Normality of distribution of the analyzed parameters was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Changes in the flare parameters over time and differences in flare parameters between itch inducers were tested with ANOVA. If the ANOVA was significant, Bonferroni-adjusted post hoc analysis test was employed to test which measurements differed significantly from the

Table 2. Pearson's r correlations between itch intensity and flare parameters measured 10 min after skin provocation with histamine, capsaicin, and cowhage

| Substance | Flare parameter | Itch parameters (Pearson's r , significance level) | | |
|-----------|--|--|--|---|
| | | peak intensity | duration | AUC |
| Histamine | Flare area (digital planimetry) | 0.283, $p = 0.123$ | 0.406, $p = 0.023^a$ | 0.409, $p = 0.022^b$ |
| | Area of increased blood flow (LSCI) | 0.575, $p = 0.001$ | 0.545, $p = 0.002^a$ | 0.649, $p < 0.001^b$ |
| | Change in maximal intensity of blood flow to baseline (LSCI) | 0.146, $p = 0.435$ | 0.200, $p = 0.280$ | 0.196, $p = 0.291$ |
| | Mean intensity of blood flow (LSCI) | 0.053, $p = 0.777$ | 0.068, $p = 0.716$ | 0.030, $p = 0.874$ |
| Capsaicin | Flare area (digital planimetry) | 0.338, $p = 0.063$ | 0.135, $p = 0.468$ | 0.271, $p = 0.141$ |
| | Area of increased blood flow (LSCI) | 0.127, $p = 0.502$ | 0.293, $p = 0.116$ | 0.123, $p = 0.516$ |
| | Change in maximal intensity of blood flow to baseline (LSCI) | 0.354, $p = 0.051$ | 0.212, $p = 0.252$ | 0.271, $p = 0.140$ |
| | Mean intensity of blood flow (LSCI) | 0.331, $p = 0.069$ | 0.158, $p = 0.395$ | 0.305, $p = 0.095$ |
| Cowhage | Area of increased blood flow (LSCI) | 0.135, $p = 0.477$ | 0.031, $p = 0.870$ | 0.240, $p = 0.202$ |
| | Change in maximal intensity of blood flow to baseline (LSCI) | 0.060, $p = 0.752$ | -0.010, $p = 0.958$ | 0.048, $p = 0.801$ |
| | Mean intensity of blood flow (LSCI) | -0.016, $p = 0.934$ | -0.029, $p = 0.878$ | 0.150, $p = 0.428$ |

AUC, area under the curve; LSCI, laser speckle contrast imaging. Significant p values are shown in bold. ^a The correlation between itch duration and area of increased blood flow measured using LSCI was not significantly different from the correlation between itch duration and flare area measured planimetrically from digital pictures, $p = 0.140$. ^b The correlation between the AUC of itch intensity and area of increased blood flow measured using LSCI was stronger than the correlation between the AUC of itch intensity and flare area measured planimetrically from digital pictures, $p = 0.022$.

initial values, and the least significant difference test was used for comparison between flare evoked by histamine, capsaicin, and cowhage. Paired-sample t test was used to test for differences in overall flare response between the AUC of flare evoked by active substances and their negative controls. Pearson's r was calculated to characterize the linear correlation between 2 continuous variables. The Hotelling test was used for comparison of overlapping correlations for dependent groups [24], and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

The Itch Induced by Histamine Is Linked to the Area but Not the Intensity of Increased Blood Flow

Histamine SPT induced itch (assessed by VAS), and it increased skin blood flow as measured by LSCI (Table 1; Fig. 1). Itch responses to histamine were significantly correlated with the size of the area of increased blood flow but not with the maximal or mean intensity of the blood flow increase as assessed by LSCI (Table 2; Fig. 2).

The Itch Induced by Capsaicin or Cowhage Is Not Linked to the Extent or Intensity of Increased Blood Flow

Skin provocation with capsaicin and cowhage also induced itch, albeit to a lesser extent than histamine. They also increased blood flow as assessed by LSCI, again to a lesser extent than histamine (Table 1). Histamine in-

creased skin blood flow (area of increased blood flow, mean and maximal blood flow) more than capsaicin ($p < 0.001$, for all flare parameters) and cowhage ($p < 0.001$, for all flare parameters) as captured by LSCI 10 min after skin provocation. Capsaicin induced larger areas of increased blood flow ($p = 0.001$) as well as a higher maximal ($p < 0.001$) and mean intensity of blood flow ($p < 0.001$) than cowhage. Importantly, itch responses to capsaicin and cowhage were not linked to changes in blood flow, neither to the size of the area of increased blood flow nor to the maximal and mean intensity of blood flow, as assessed by LSCI (Table 2).

The Itch Response to Histamine Is Linked to the Size of the Visible Flare

The itch response to histamine was significantly and moderately correlated with the size of the flare as assessed by macroscopic quantitative planimetric morphometry (Table 2). The correlation between itch intensity (AUC) and flare area was significantly weaker than the correlation of itch intensity (AUC) and the area of increased blood flow as measured by LSCI (Table 2). The size of the flare (measured by macroscopic quantitative planimetric morphometry) was strongly correlated with the area of increased blood flow (measured by LSCI) 10 min after SPT ($r = 0.731$, $p < 0.001$).

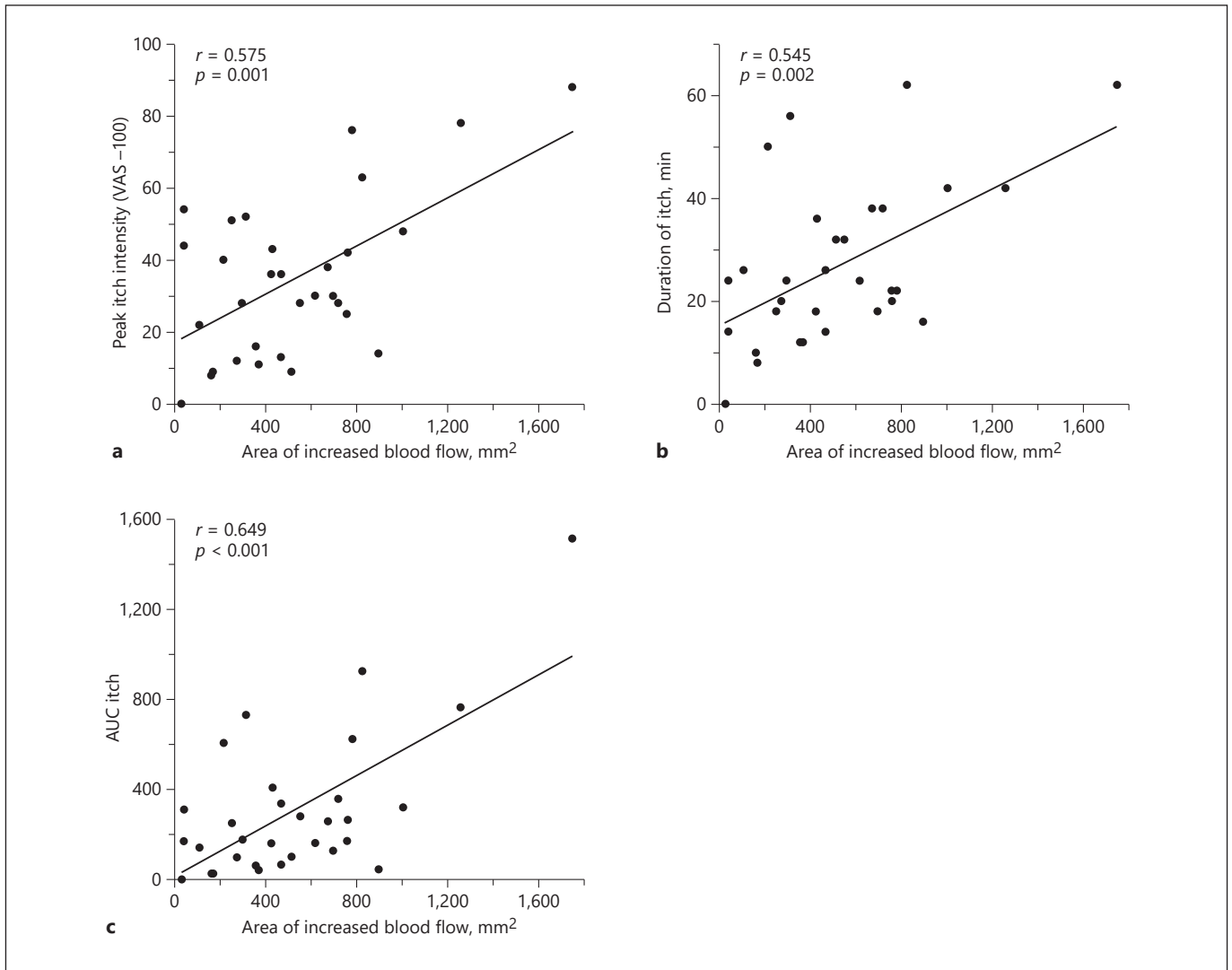


Fig. 2. Increase in blood flow correlates with histamine-induced itch. Area of increased blood flow (mm^2) measured with LSCI 10 min after SPT with histamine correlated with peak itch intensity (**a**), itch duration (**b**), and itch AUC (**c**). LSCI, laser speckle contrast imaging; SPT, skin prick testing; AUC, area under the curve; VAS, visual analog scale.

Discussion

This study demonstrates that the size of the flare at sites of histamine-induced skin inflammatory responses correlates with the itch that comes with these responses. This link is best assessed by measurements of skin blood flow, but it is also evident when flare size is measured planimetrically.

The kinetics and extent of the skin responses to histamine in our study are similar to those reported previously. In line with earlier work, we observed the greatest increase in blood flow induced by histamine at the first

measurement after skin provocation. The blood flow response then gradually declined within 90 min, both in terms of its area and intensity [6]. Both the flare response and the itch induced by histamine are mediated by histamine-sensitive mechano-insensitive C-fibers (CMi fibers) [2, 25]. That the area of histamine-induced increased blood flow, but not its intensity, correlates with itch suggests that both reflect the activation level of the same histamine-sensitive CMi fibers. Our results are consistent with those of previous studies in which histaminergic itch correlated with flare area assessed by LSCI and LDI [20, 21]. To our best knowledge, flare intensity has

not yet been tested for its relationship with the intensity of experimentally induced itch.

Measuring flare reactions has previously been proposed as a test for the function of CMi fibers [26], and flare size measurements were validated for the assessment of small nerve fiber neuropathy in patients with diabetes mellitus [22]. Of note, the functional impairment of CMi fibers in patients with small fiber neuropathy was linked to a diminished flare size but not flare intensity after electrical stimulation [26] and after iontophoresis with histamine [27]. Our data are in line with this, as these previous studies and ours indicate that flare area is a more sensitive parameter than flare intensity for the function of CMi fibers [26, 27]. The flare area depends directly on the size and functional integrity of receptive fields of the axonal tree and on fiber density [28, 29]. In contrast, the flare intensity depends on vascular smooth muscle reactivity, the spatial distribution of the release and degradation of vasodilators such as calcitonin gene-related peptide [28]. Taken together, these data and our results suggest that the area of histamine-induced flare may be used as a surrogate marker of experimentally induced histaminergic itch. The correlations between flare size and itch parameters were moderate to strong, and they were better using LSCI than planimetry. Recording of itch using a well-established VAS or numeric rating scale is still faster and easier than using an advanced technique such as LSCI. However, assessment of itch has limitations and is prone to bias, resulting from its subjective nature [30], cultural or ethnic differences [31], and cognitive limitations in young children and elderly subjects [32]. There are application areas where subjective assessment of itch due to its limitations might be replaced or complemented by flare assessment, such as in young children, subjects with cognitive deficits, settings resulting in high subjective bias or attentional distraction, or animal studies.

The transmission of capsaicin-induced itch in humans is still not sufficiently understood. Transient receptor potential vanilloid 1 receptors are expressed ubiquitously on sensory neurons, which implies that capsaicin-induced itch may involve many classes of sensory neurons [33]. Capsaicin activates a subpopulation of mechano-heat-sensitive C (CMH) fibers (i.e., quickly adapting to stepped heat stimulus CMH fibers) [34], mechano-heat-sensitive A fibers [35], and CMi fibers [36], including a subpopulation of silent nociceptors, which become responsive to heat or mechanical stimuli after sensitization, part of which may mediate itch, and which contribute to flare responses [2, 3]. The CMi fibers due to their excessive terminal branching have the biggest innervation territo-

ries, and therefore, their activation probably determines the size of histamine- and capsaicin-induced flare reactions [2, 37]. CMi fiber activation by capsaicin is weaker than that by histamine, as shown using microneurography [36]. Therefore, it is possible that weaker activation of CMi fibers by capsaicin than by histamine results also in a smaller flare area, which we observed in our experiments and was previously reported [16]. Furthermore, the involvement of many classes of cutaneous afferents in itch evoked by capsaicin may explain the lack of correlation between flare and itch observed in our study by means of LSCI and planimetry and previously using planimetry [16, 17]. Another explanation of the bigger flare area after histamine provocation might be a better skin diffusion of histamine than of capsaicin, resulting in reaching and activation of more nerve fibers. However, direct comparisons of diffusion and bioavailability between histamine and capsaicin are missing.

Skin provocation with cowhage is known to induce strong itch responses and minimal flare reactions [9, 16, 38]. In our study, cowhage-induced flare reactions were also very subtle and much smaller than histamine- and capsaicin-induced flare reactions. Cowhage activates CMH fibers and mechano-heat-sensitive A fibers [39] but not CMi fibers [40]. The innervation areas of CMH fibers are approximately 3 times smaller than those of CMi fibers [37]. It has been also demonstrated that electrical stimulation of CMH fibers induces only a brief and spatially limited increase in skin blood flow as compared to electrical stimulation of CMi fibers [3]. This may explain why changes in blood perfusion induced by cowhage do not correlate with itch intensity.

Planimetric measurements of the histamine-induced flare area from digital pictures correlated with histamine-induced itch; however, this relationship was weaker than the association of itch and blood flow assessed by LSCI. Previous studies, in which flare was measured with a ruler, reported contradictory results where no [17], a weak [16], or a moderate correlation [19] between flare and itch induced by histamine was found. LSCI seems to better reflect this relationship than macroscopic quantitative planimetric morphometry, which can explain the inconsistency of these previous reports. Our observation that histaminergic itch reflects the size of flare responses is in line with clinical observations made in patients with histamine-mediated skin symptoms, for example, in patients with cholinergic urticaria where wheals come with intense itch and large erythematous flare responses [41].

It must be noted that LSCI enables continuous recording of blood flow, an advantage that was not fully taken

in our study, due to methodological limitations of parallel recording of itch and flare. Time-matched recording of itch and flare in future studies, provided that methodology of itch rating could be adapted accordingly, could further help characterize the relationship between itch and flare. A further limitation of this study is that only healthy controls were included. Thus, extrapolation of its results to different patient groups must be done with caution, unless further studies have not investigated these relationships in patients.

Taken together, our study shows that the area of increased blood flow, but not the intensity of blood flow, correlates with histamine-induced itch. This relationship was more consistent with the use of LSCI than digital photography for flare assessment. Our findings suggest that in clinical conditions involving histamine-dependent skin reactions, the flare size may reflect itch intensity. In the experimental models of histamine-dependent itch, the flare area measured with LSCI may be used as a surrogate parameter of itch, reflecting the activation level of CMi fibers.

Acknowledgements

We would like to thank Ethan Lerner who kindly provided us with cowhage spicules. We would like to thank Janis Brusius from Moor Instruments for his outstanding support with application of the LSCI.

References

- 1 Chapman LF. Mechanisms of the flare reaction in human skin. *J Invest Dermatol*. 1977 Jul;69(1):88–97.
- 2 Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci*. 1997 Oct; 17(20):8003–8.
- 3 Schmelz M, Michael K, Weidner C, Schmidt R, Torebjörk HE, Handwerker HO. Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin? *Neuroreport*. 2000 Feb;11(3):645–8.
- 4 Gibson RA, Robertson J, Mistry H, McCallum S, Fernando D, Wyres M, et al. A randomised trial evaluating the effects of the TRPV1 antagonist SB705498 on pruritus induced by histamine, and cowhage challenge in healthy volunteers. *PLoS One*. 2014;9(7):e100610.
- 5 Andersen HH, Elberling J, Arendt-Nielsen L. Human surrogate models of histaminergic and non-histaminergic itch. *Acta Derm Venereol*. 2015 Sep;95(7):771–7.
- 6 Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, et al. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. *Allergy*. 2016 Dec;71(12):1745–52.
- 7 Hawro T, Fluhr JW, Mengeaud V, Redoulès D, Church MK, Maurer M, et al. Polidocanol inhibits cowhage: but not histamine-induced itch in humans. *Exp Dermatol*. 2014 Dec; 23(12):922–3.
- 8 Andre F, Fluhr JW, Hawro T, Church MK, Maurer M, Metz M. Characterization of cowhage-induced pruritus in inflamed and non-inflamed skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(1):202–6.
- 9 Papoiu AD, Tey HL, Coghil RC, Wang H, Yosipovitch G. Cowhage-induced itch as an experimental model for pruritus. A comparative study with histamine-induced itch. *PLoS One*. 2011;6(3):e17786.
- 10 Simons FE, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Dec; 128(6):1139–e4.
- 11 Kollmeier A, Francke K, Chen B, Dunford PJ, Greenspan AJ, Xia Y, et al. The histamine H₄ receptor antagonist, JNJ 39758979, is effective in reducing histamine-induced pruritus in a randomized clinical study in healthy subjects. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Jul;350(1):181–7.
- 12 Reddy VB, Iuga AO, Shimada SG, LaMotte RH, Lerner EA. Cowhage-evoked itch is mediated by a novel cysteine protease: a ligand of protease-activated receptors. *J Neurosci*. 2008 Apr;28(17):4331–5.
- 13 Henehan M, De Benedetto A. Update on protease-activated receptor 2 in cutaneous barrier, differentiation, tumorigenesis and pigmentation, and its role in related dermatologic diseases. *Exp Dermatol*. 2019 Aug;28(8): 877–85.
- 14 LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EF. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol*. 1991 Jul;66(1):190–211.
- 15 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct;389(6653): 816–24.
- 16 Sikand P, Shimada SG, Green BG, LaMotte RH. Similar itch and nociceptive sensations evoked by punctate cutaneous application of capsaicin, histamine and cowhage. *Pain*. 2009 Jul;144(1–2):66–75.

Statement of Ethics

This study was approved by the local Ethics Committee of the Charité – Universitätsmedizin Berlin (EA 4/063/13). All participants gave informed consent.

Conflict of Interest Statement

The authors have no relevant conflicts of interest in relation to this manuscript.

Funding Sources

This work was supported in part by the International Institute of Dermatological Allergy (I²DEAL).

Author Contributions

S.L. analyzed the data, performed literature research, and drafted the manuscript. E.D. performed the experiments. M.Me. contributed to study conception and design. M.M. contributed to study conception and design, and drafted the manuscript. T.H. contributed to study conception and design, analyzed the data, and drafted the manuscript. All authors collaborated in retrieval of the data and data interpretation, and provided critical review and final approval of the manuscript before submission.

- 17 Sikand P, Shimada SG, Green BG, LaMotte RH. Sensory responses to injection and punctate application of capsaicin and histamine to the skin. *Pain*. 2011 Nov;152(11):2485–94.
- 18 Hawro T, Lehmann S, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, et al. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Sep;33(9):1755–61.
- 19 Darsow U, Ring J, Scharein E, Bromm B. Correlations between histamine-induced wheal, flare and itch. *Arch Dermatol Res*. 1996 Jul;288(8):436–41.
- 20 Andersen HH, Elberling J, Lo Vecchio S, Arndt-Nielsen L. Topography of itch: evidence of distinct coding for pruriception in the trigeminal nerve. *Itch*. 2017 Mar;2(1):e2.
- 21 Johaneck LM, Meyer RA, Hartke T, Hobelmann JG, Maine DN, LaMotte RH, et al. Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch. *J Neurosci*. 2007 Jul;27(28):7490–7.
- 22 Caselli A, Spallone V, Marfia GA, Battista C, Pachatz C, Veves A, et al. Validation of the nerve axon reflex for the assessment of small nerve fibre dysfunction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Aug;77(8):927–32.
- 23 Briers JD. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. *Opt Appl*. 2007;37(1).
- 24 Diedenhofen B, Musch J. cocor: a comprehensive solution for the statistical comparison of correlations. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121945.
- 25 Schley M, Rukwied R, Blunk J, Menzer C, Konrad C, Dusch M, et al. Mechano-insensitive nociceptors are sufficient to induce histamine-induced itch. *Acta Derm Venereol*. 2013 Jul;93(4):394–9.
- 26 Krämer HH, Schmelz M, Birklein F, Bickel A. Electrically stimulated axon reflexes are diminished in diabetic small fiber neuropathies. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):769–74.
- 27 Bickel A, Krämer HH, Hilz MJ, Birklein F, Neundörfer B, Schmelz M. Assessment of the neurogenic flare reaction in small-fiber neuropathies. *Neurology*. 2002 Sep;59(6):917–9.
- 28 Geber C, Fondel R, Krämer HH, Rolke R, Treede RD, Sommer C, et al. Psychophysics, flare, and neurosecretory function in human pain models: capsaicin versus electrically evoked pain. *J Pain*. 2007 Jun;8(6):503–14.
- 29 Bickel A, Heyer G, Senger C, Maihöfner C, Maihöfner C, Heuss D, et al. C-fiber axon reflex flare size correlates with epidermal nerve fiber density in human skin biopsies. *J Peripher Nerv Syst*. 2009 Dec;14(4):294–9.
- 30 Udkoff J, Silverberg JI. Validation of scratching severity as an objective assessment for itch. *J Invest Dermatol*. 2018 May;138(5):1062–8.
- 31 Reich A, Heisig M, Phan NQ, Taneda K, Takamori K, Takeuchi S, et al. Visual analogue scale: evaluation of the instrument for the assessment of pruritus. *Acta Derm Venereol*. 2012 Sep;92(5):497–501.
- 32 Wahlgren CF. Children's rating of itch: an experimental study. *Pediatr Dermatol*. 2005 Mar–Apr;22(2):97–101.
- 33 Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, et al. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol*. 2004 Mar;13(3):129–39.
- 34 Wooten M, Weng HJ, Hartke TV, Borzan J, Klein AH, Turnquist B, et al. Three functionally distinct classes of C-fibre nociceptors in primates. *Nat Commun*. 2014 Jun;5:4122.
- 35 Baumann TK, Simone DA, Shain CN, LaMotte RH. Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *J Neurophysiol*. 1991 Jul;66(1):212–27.
- 36 Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjörk HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol*. 2003 May;89(5):2441–8.
- 37 Schmidt R, Schmelz M, Weidner C, Handwerker HO, Torebjörk HE. Innervation territories of mechano-insensitive C nociceptors in human skin. *J Neurophysiol*. 2002 Oct;88(4):1859–66.
- 38 LaMotte RH, Shimada SG, Green BG, Zeltzman D. Pruritic and nociceptive sensations and dysesthesias from a spicule of cowhage. *J Neurophysiol*. 2009 Mar;101(3):1430–43.
- 39 Ringkamp M, Schepers RJ, Shimada SG, Johaneck LM, Hartke TV, Borzan J, et al. A role for nociceptive, myelinated nerve fibers in itch sensation. *J Neurosci*. 2011 Oct;31(42):14841–9.
- 40 Namer B, Carr R, Johaneck LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M. Separate peripheral pathways for pruritus in man. *J Neurophysiol*. 2008 Oct;100(4):2062–9.
- 41 Jorizzo JL, Smith EB. The physical urticarias. An update and review. *Arch Dermatol*. 1982 Mar;118(3):194–201.

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

Hawro T, Lehmann S, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. Allergy. 2016; 71 (12): 1745-52.

<https://doi.org/10.1111/all.12995>

14. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

15. Publikationsliste

1. Hawro T, **Lehmann S**, Deuring E, Weller K, Altrichter S, Church MK, Maurer M, Metz M. Comparison of pruritus and sensory qualities induced by capsaicin, histamine and cowhage. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(9):1755-61
2. **Lehmann S**, Deuring E, Weller K, Scheffel J, Metz M, Maurer M, Hawro T. Flare Size but not Intensity reflects histamine-induced itch. *Skin Pharmacol Physiol*. 2020;33(5):244-52
3. Hawro T, **Lehmann S**, Altrichter S, Fluhr JW, Zuberbier T, Church MK, Maurer M, Metz M. Skin provocation tests may help to diagnose atopic dermatitis. *Allergy*. 2016; 71 (12):1745-52
4. **Wiercimak S**, Petriczko E, Horodnicka-Józwa A, Dawid G, Kraśnikow E, Hempel-Osipowicz E, Walczak M. Hypoparathyroidism with calcifications in the central nervous system in an 8-year-old boy -case report. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2009; 15 (4):275-8

16. Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre ohne Hilfe und Unterstützung von vielen Personen, bei denen ich mich herzlich bedanken möchte, nicht möglich gewesen.

Mein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Marcus Maurer, der mir ermöglicht hat, die Promotion innerhalb seiner Arbeitsgruppe zu absolvieren. Seine konstruktiven Anregungen waren für mich von großer Bedeutung.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Karsten Weller, für sehr gute Zusammenarbeit, seine wissenschaftliche Unterstützung, hilfreiche Ratschläge bei Erstellung dieser Dissertation als auch für die konstruktive Revision.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Tomasz Hawro für die engagierte Betreuung bei der Durchführung der Experimente, Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie für zielführenden Diskussionen und kritische Durchsicht der Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Martin Metz für seine Hilfsbereitschaft, fachliche Unterstützung und Ansprechbarkeit bei allen meinen Fragen.

Der gesamten Arbeitsgruppe, die mich herzlich aufgenommen hat, möchte ich für das angenehme und freundliche Arbeitsklima bedanken.

Ein großer Dank gebührt allen Probanden und Patienten, die den langen (und quälend juckenden) Experimenten ihre Zeit geschenkt haben.

Ganz besonders möchte ich meinem Mann, Grzegorz Lehmann, für seine unendliche Geduld, liebevolle Unterstützung und stetige Motivation und schließlich für die Sprachkorrektur dieser Dissertation bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Sohn, Jan, der mich zu meinen Bestrebungen inspiriert hat. Seine fröhliche Anwesenheit hat mir immer viel Kraft gegeben.