

USO SINERGICO DELLA REOLOGIA E DELLA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE A BASSO CAMPO PER CARATTERIZZARE L'ESPETTORATO DI PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Michela Abrami, PhD¹, Massimo Maschio, MD², Massimo Conese, MD³, Marco Confalonieri, MD⁴, Fabio Gerin PhD¹, Barbara Dapas PhD⁵, Rossella Farra PhD⁵, Alessandra Adrover PhD⁶, Lucio Torelli PhD⁷, Gabriele Grassi, MD-PhD⁵, Mario Grassi, PhD¹

1 Dipartimento di Ingegneria e Architettura, Università degli Studi di Trieste, Via Valerio 6/A, I-34127 Trieste, Italia

2 Istituto per la salute Materna ed Infantile, IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria, 65, I-34137, Trieste, Italia

3 Dipartimento di Scienza Mediche e Chirurgiche, Università di Foggia, Ospedali Riuniti, Via L. Pinto, 1, I-71122 Foggia, Italia

4, Dipartimento di Pneumologia, Ospedale di Cattinara, Strada di Fiume 447, I-34149 Trieste, Italia

5 Dipartimento di Scienze della Vita, Ospedale Universitario di Cattinara, Strada di Fiume 447, I-34149 Trieste, Italia

6 Dipartimento Ingegneristico di Chimica dei Materiali e dell'Ambiente, Università la Sapienza di Roma, Via Eudossiana 18, I-00184 Roma, Italia

7 Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Trieste, Ospedale Universitario di Cattinara, Strada di Fiume 447, I-34149

Abstract

Il muco denso, viscoso e iper-concentrato presente nei polmoni dei pazienti affetti da fibrosi cistica (CF) ostruisce i bronchi favorendo l'instaurarsi di ripetute infezioni batteriche. L'espettorato di pazienti CF è stato sottoposto ad indagine reologica e con NMR a basso campo, fornendo informazioni sulla viscoelasticità (G_0 , η_0) ed idratazione del muco (T_{2avg}). Si sono, quindi, ricercate i) correlazioni tra proprietà reologiche e magnetiche ii) correlazioni di queste con lo stato clinico del paziente dato dalla spirometria (FEV_1) iii) stime sulla struttura del reticolo polimerico del muco. L'assenza di correlazione tra i parametri riferiti a rilassamento magnetico e meccanico-reologico rileva che questi fenomeni sono legati a diversi aspetti della struttura dell'espettorato. Tuttavia, esistono correlazioni tra FEV_1 , T_{2avg} e le proprietà reologiche G_0 , η_0 . Inoltre, T_{2avg} correla con il *mucoiliary clearability index* (MCI) e il *cough clearability index* (CCI), indici derivati dalla caratterizzazione reologia. Lo stato clinico del paziente può essere, quindi, riassunto anche dal solo parametro T_{2avg} . Infine le informazioni derivanti dalle due caratterizzazioni consentono di stimare la distribuzione dimensionale delle maglie del reticolo polimerico che pervade l'espettorato, dato di grande utilità per conoscere la diffusività dei farmaci nel muco.

Hyper-concentrated and more viscous mucus presents in the lungs of patients suffering from cystic fibrosis (CF) provoke mucus stasis providing an optimal environment for bacterial growth. The sputum of CF patients has been subjected to rheological and low-field NMR investigation, providing information on i) the state of viscoelasticity (G_0 , η_0) and mucus hydration (T_{2avg}), ii) possible correlations also with parameter of patients clinical status given by spirometry(FEV_1) iii) the structure of the polymeric network in mucus. The absence of correlation among magnetic and mechanical-rheological relaxation notes that these phenomena are linked to different aspects of sputum. However, correlations exist among FEV_1 , T_{2av} and rheological properties G_0 , η_0 . Moreover, T_{2avg} correlates with the *mucoiliary clearability index* (MCI) and *cough clearability index* (CCI), two indices derived from the rheological characterization. The clinical condition of the patient can, therefore, be summarized by T_{2avg} alone. Finally, information from the two characterizations make it possible to estimate the mesh size distribution of the polymeric network pervading sputum. This knowledge is very useful to better understand drugs penetration in mucus.

Keywords

Fibrosi cistica, espettorato, NMR a basso campo, distribuzione dimensionale delle maglie, rilassamento meccanico e magnetico

Cystic fibrosis, sputum, low field NMR, mesh size distribution, mechanical and magnetic relaxation

1. INTRODUZIONE

La fibrosi cistica è una malattia autosomica recessiva causata dalla mutazione di un gene codificante per la proteina canale *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Kerem et al. 1989; Welsh 2015) che viene maggiormente espressa dai tessuti delle vie aeree (Cantin et al. 2015). Il ruolo principale di questa proteina canale è quello di regolare lo scambio cloruro-bicarbonato e acqua tra ambiente intra- ed extra-cellulare, garantendo l'equilibrio osmotico e l'idratazione dei due strati dell'*ASL* (*Airway surface layer*) (Hill et al. 2018) che rivestono le vie aeree, ovvero il *PCL* (*periciliary liquid layer*) e lo strato mucoso (**Figura 1**).

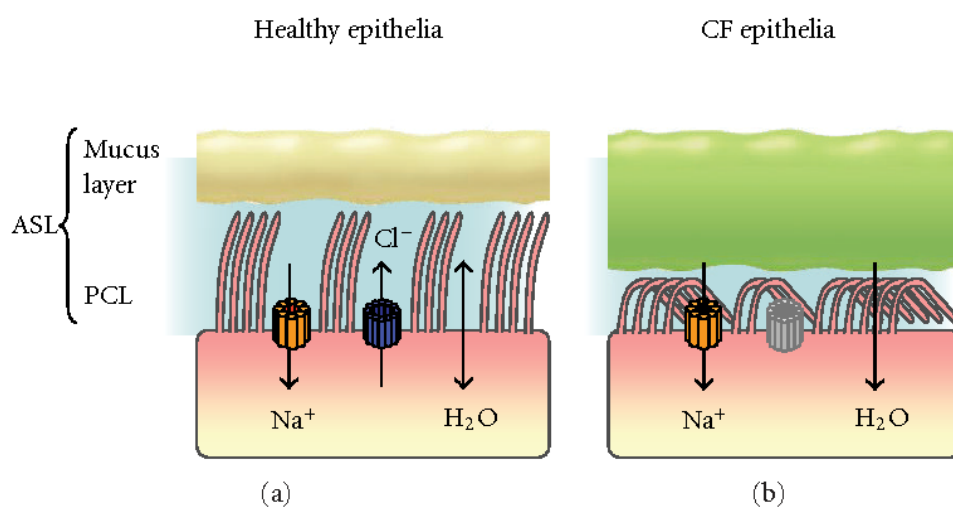


Figura 1. L'ASL (*Airway Surface Layer*), il film che riveste le vie aeree, è costituito da due strati: il PCL (*Periciliary Liquid Layer*) e lo strato mucoso. Nei pazienti CF (immagine (b) a destra), la mutazione della proteina CFTR altera lo scambio di acqua tra l'ambiente intra- ed extra cellulare (Reeves et al. 2012).

L'alterazione di questo canale, o la sua disattivazione, provoca, inevitabilmente, uno squilibrio nell'efflusso di ioni cloro con conseguente calo del flusso di acqua verso l'ASL. Ciò, a sua volta, si riflette sulla disidratazione del muco, causa di una variazione della pressione osmotica che, infine, determina il collasso del *PCL* (Boucher 2004). Tutto ciò provoca una stasi del muco che diventa un ambiente ideale per la crescita dei batteri con conseguente ipersecrezione di mucine e infiltrazione di neutrofili (Ehre et al. 2014). Di conseguenza, i pazienti affetti di fibrosi cistica (CF) presentano uno stato infiammatorio polmonare cronico causato dall'ostruzione bronchiale del muco denso che favorisce l'instaurarsi di ripetute infezioni batteriche. Ciò comporta nel tempo un progressivo decadimento delle funzioni polmonari, ad oggi la principale causa di morte in questi pazienti (Welsh 2015). Ne deriva, quindi, l'importanza che riveste il muco e, soprattutto, la *clearance* muco-ciliare, durante il decorso della malattia (Rubin 2007).

Dal punto di vista reologico, il muco esibisce proprietà elastiche e viscosi. Infatti, il complesso reticolo polimerico interpenetrato che lo pervade, composto da mucine, proteine globulari, proteine antimicrobiche e peptidi, è in grado di intrappolare al suo interno grandi quantità di acqua (>90% w/w) contenenti diverse specie ioniche. Se il reticolo conferisce elasticità al muco, la labilità dei legami (fisici e/o topologici) tra le catene del reticolo fanno sì che il muco possa fluire sotto l'azione di un opportuno stress. Da questo punto di vista, il muco è un fluido non-Newtoniano caratterizzato da un comportamento *shear thinning* (Cone 2009). Cambiamenti nelle proprietà reologiche del muco possono ostacolare notevolmente la sua funzione di lubrificante, di barriera selettiva e prima linea di difesa contro le infezioni (Lai et al. 2009). Pertanto, dalle analisi sullo stato d'idratazione e sulle sue proprietà viscoelastiche si ottengono informazioni molto affidabili sullo stato della malattia e sull'efficacia della terapia seguita dal paziente. Infatti, uno dei principali approcci terapeutici contro l'accumulo di muco è proprio l'idratazione di quest'ultimo che aumenta la *muco ciliary clearance* (MCC), ovvero la rimozione del muco a seguito del movimento coordinato delle ciglia (Tildy and Rogers 2015).

In questa cornice s'inserisce, quindi, questo lavoro di ricerca che prevede l'uso della reologia, supportata dall'NMR a basso campo, per determinare le proprietà viscoelastiche, il livello di idratazione e la struttura del reticolo polimerico del muco in pazienti CF. Infatti, le forti esacerbazioni cliniche sono una peculiarità dei pazienti CF e sono correlate alla disidratazione delle secrezioni respiratorie che si riflette nell'alterazione delle proprietà viscoelastiche (Serisier et al. 2009). Poiché la raccolta del muco dai polmoni di pazienti CF è una pratica molto invasiva, l'analisi dell'espettorato denso e purulento, ottenuto su base volontaria, rappresenta una valida alternativa. Sebbene la caratterizzazione reologica dell'espettorato possa presentare dei problemi sperimentali legati alla scarsa quantità ed eterogeneità di campione, alla contaminazione della saliva ed alla conservazione del campione prima della misura (Radtke et al. 2018; Serisier et al. 2009), nostri studi preliminari (Abrami et al. 2020) e studi recenti sembrano indicare la possibilità di impiegare la reologia per correlare le caratteristiche viscoelastiche degli espettorati con FEV₁ (volume di aria espirato forzatamente in un secondo) (Ma et al. 2018; Nettles et al. 2014; Tomaiuolo et al. 2014) visto, anche, che le proprietà dell'espettorato sono strettamente collegate a quelle del muco (Lai et al. 2009). Infatti, è stato dimostrato che, in pazienti CF, la concentrazione delle principali mucine e dei frammenti di DNA aumentano sia nel muco che nell'espettorato con l'aggravarsi della malattia (Fung et al. 2015).

Numerose ricerche approssimano l'espettorato CF ad un idrogel in virtù dei legami tra le catene di mucina e le fibre di DNA associate alle proteine granulari rilasciate dai neutrofili. Le concentrazioni di queste componenti sono alterate come diretta conseguenza della sovrapproduzione di muco, della sua disidratazione e del prolungato stato di infiammazione (Henderson et al. 2014; Manzenreiter et al. 2012). Concordano con queste affermazioni, i nostri precedenti studi sugli espettorati CF dove, mediante NMR a basso campo, si è andati a monitorare il livello di idratazione delle esacerbazioni trovando significative correlazioni con la spirometria (FEV_1) e le citochine infiammatorie (Abrami et al. 2020; Abrami, Ascenzioni, et al. 2018). In questo progetto è stata introdotta l'analisi reologica al fine di valutare a) la correlazione tra le proprietà reologiche, il tempo di rilassamento degli idrogeni delle molecole d'acqua intrappolate nell'espettorato (T_{2m}) e FEV_1 e b) l'effetto sinergico della caratterizzazione reologica e LF-NMR dell'espettorato di pazienti CF.

2. DETTAGLI SPERIMENTALI

I 31 campioni di espettorato sono stati forniti dal Centro Regionale Fibrosi Cistica all'interno dell'Ospedale Burlo Garofalo, seguendo una procedura approvata dalla commissione etica (prot n. 496/2916, CI M-11, 22-3-2016). Il consenso informato scritto è stato ottenuto da ciascun paziente. La raccolta dell'espettorato è stata eseguita prima di ogni sessione di terapia nei pazienti adulti capaci di espettorare. Non sono stati considerati pazienti non espettoranti e soggetti sotto i 7 anni d'età (criteri di esclusione). Nell'ottica di correlare in un ampio range di valori di FEV_1 il modulo di taglio G , il tempo di rilassamento medio T_{2m} dell'espettorato, sono stati selezionati i pazienti con un FEV_1 uniformemente distribuito tra valori bassi ($\approx 30\%$) e alti ($\approx 85\%$) (criteri di inclusione). Tali criteri hanno permesso il reclutamento della maggior parte dei pazienti afferenti al Centro Regionale Fibrosi Cistica. I campioni di espettorato ottenuti su base volontaria (1-2 mL) vengono raccolti in contenitori sterili e sono immediatamente usati per la determinazione del T_{2m} . In seguito, vengono trasferiti dal tubo dell'NMR a basso campo al supporto per la prova reologica.

2.1 CARATTERIZZAZIONE REOLOGICA

La caratterizzazione reologica dei campioni è stata condotta mediante prove di *stress sweep*, *frequency sweep* e *steady value test*. Lo stress sweep, condotto alla frequenza (f) costante di 1 Hz ha permesso di determinare il limite della regione viscoelastica lineare, informazione

imprescindibile per poter dedurre alcuni dettagli nano-strutturali dell'espettorato dalle prove di *frequency sweep*, eseguite nell'intervallo di frequenza 10 - 0.01 Hz. I dati derivanti dal Frequency sweep sono stati, poi, interpretati, mediante il modello di Maxwell generalizzato:

$$G' = \sum_{i=1}^{n_R} g_i \frac{(\lambda_i \omega)^2}{1+(\lambda_i \omega)^2} \quad (1)$$

$$G'' = \sum_{i=1}^{n_R} g_i \frac{(\lambda_i \omega)}{1+(\lambda_i \omega)^2} \quad (2)$$

dove G' e G'' sono, rispettivamente, il modulo elastico e quello viscoso, ω è la pulsazione ($= 2\pi f$), n_R è il numero degli elementi di Maxwell considerati, mentre g_i , η_i e λ_i rappresentano, rispettivamente, il modulo elastico, quello viscoso ed il tempo di rilassamento del i^{esimo} elemento di Maxwell. Il fitting simultaneo delle equazioni (1) e (2) sui dati sperimentali di G' e G'' è stato fatto assumendo che λ_i sia scalato di un fattore 10 ($\lambda_{i+1} = 10\lambda_i$) (Lapasin and Pricl 1998). Quindi, i parametri del modello sono $1+n_R$ (i.e., λ_1, g_i ($1 < i < n_R$)). Il valore di n_R viene scelto in base ad una procedura statistica (Draper and Smith 1981) volta alla minimizzazione del prodotto $\chi^2 * (1 + n_R)$, dove χ^2 è la somma degli scarti quadratici. Il modulo di taglio G_0 del campione è stato valutato come somma di tutti i g_i ($G_0 = \sum g_i$) (Abrami et al. 2019).

Una volta determinato il valore di G_0 , la teoria di Flory (Flory 1953) permette di valutare la densità di reticolazione del reticolo polimerico, ρ_x , definita come le moli di punti di giunzione tra le diverse catene polimeriche per unità di volume:

$$\rho_x = G_0 / RT \quad (3)$$

dove R è la costante universale di gas e T è la temperatura assoluta. Infine, la teoria del network equivalente (Schurz 1991) permette di stabilire una relazione tra ρ_x e la dimensione media delle maglie del polimero (ξ). Infatti, la struttura reale del reticolo polimerico è rimpiazzata da una ideale costituita da un perfetto arrangiamento cubico 3D che condivide con il reticolo reale la stessa ρ_x . Siccome ξ è definita come la distanza tra due punti di reticolazioni consecutivi, il volume

associato ad ogni punto di reticolazione $((4/3)\pi(\xi/2)^3)$ è uguale a $1/(N_A \rho_x)$, essendo N_A il numero di Avogadro. ρ_x e ξ sono, di conseguenza, connesse dalla seguente relazione:

$$\xi = \sqrt[3]{6/\pi\rho_x N_A} \quad (4)$$

La caratterizzazione reologica permette anche di stimare la funzionalità/infiammazione dei polmoni attraverso la valutazione di 2 indici, il *mucociliary clearability index (MCI)* e il *cough clearability index (CCI)*, definiti negli anni '80 da King e collaboratori (King 1998; King et al. 1985; King 1987):

$$MCI = 1.62 - 0.22 \cdot \text{Log}_{10}(G_1^*) - 0.77 \cdot \tan(\delta_1) \quad (5)$$

$$CCI = 3.44 - 1.07 \cdot \text{Log}_{10}(G_{100}^*) + 0.89 \cdot \tan(\delta_{100}) \quad (6)$$

dove:

$$G_1^* = \sqrt{(G_1')^2 + (G_1'')^2} \quad G_{100}^* = \sqrt{(G_{100}')^2 + (G_{100}'')^2} \quad (7)$$

$$\tan(\delta_1) = G_1''/G_1' \quad \tan(\delta_{100}) = G_{100}''/G_{100}' \quad (8)$$

I coefficienti numerici che appaiono nelle equazioni (5) e (6) si riferiscono ad una misura in dyne/cm^2 (e non in Pa) di G' e G'' (King 1998; King et al. 1985; King 1987). In aggiunta, i pedici "1" e "100" indicano, rispettivamente, che le relative quantità fisiche sono state calcolate a 1 rad/s e 100 rad/s. Infatti, i due principali meccanismi per la rimozione del muco da parte delle vie aeree consistono nell'azione delle ciglia (*MCI*) e, in caso questa fallisse, dalla tosse (*CCI*) (App et al. 1998). Poiché le ciglia battono, approssimativamente, con una frequenza compresa tra 10 e 20 Hz e con un'ampiezza di $5\mu\text{m}$, la velocità di trasporto del muco (frequenza * ampiezza) risulta essere di circa 1 cm/min. Al contrario, la velocità di trasporto del muco durante un colpo di tosse è 100 volte maggiore. Pertanto, misure viscoelastiche a bassa pulsazione/frequenza (1 rad/s) sono appropriate per simulare la rimozione del muco da parte delle ciglia, mentre le misure ad alta pulsazione/frequenza (100 rad/s) dovrebbero essere predittive della muco-rimozione da parte

della tosse. Infine, le equazioni (7) e (8) indicano che un muco viscoso (alto $\tan(\delta_{100})$) favorisce la muco-rimozione da parte dei colpi di tosse (CCI aumenta), mentre un muco elastico (basso $\tan(\delta_1)$) favorisce la muco-rimozione da parte delle ciglia (MCI aumenta)(Gosselink et al. 2006). In virtù del reometro usato in questo lavoro (reometro rotazionale a stress controllato MARS III), abbiamo seguito le indicazioni di Tomaiuolo e collaboratori (2014) cosicché sono stati scelti i 10 rad/s come condizione di alta pulsazione/frequenza al fine di prevenire errori sperimentali connessi con gli effetti inerziali.

Un ulteriore importante mezzo per la caratterizzazione reologica dell'espettorato viene dalla determinazione della curva di flusso (steady value test SV) che è mirata alla valutazione della dipendenza della viscosità dell'espettorato (η) dalla velocità di deformazione ($\dot{\gamma}$):

$$\eta(\dot{\gamma}) = \tau / \dot{\gamma} \quad (9)$$

dove τ è lo sforzo applicato al campione. La curva di flusso così ottenuta viene fittata mediante il modello di Cross (Cross 1965):

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (\lambda_c \dot{\gamma})^n} \quad (10)$$

dove η_0 e η_{∞} indicano, rispettivamente, il valore asintotico della viscosità quando la velocità di deformazione è nulla o infinitamente grande, λ_c è un tempo caratteristico mentre n misura la dipendenza di η da $\dot{\gamma}$ tra η_0 e η_{∞} .

Tutte le misure reologiche sono state condotte in triplicato con un reometro rotazionale a sforzo controllato (Reometro Haake Mars, 379-0200 Thermo elettronico GmbH, Karlsruhe, Germania) equipaggiato con una geometria cono piatto (C35, diametro=35mm)

2.2 CARATTERIZZAZIONE LF NMR

L'NMR valuta la risposta magnetica, dovuta ad una variazione di un campo magnetico esterno, di quegli atomi, tra cui l'idrogeno, che, possedendo un numero dispari di protoni e/o neutroni, sono

caratterizzati da un momento magnetico permanente. Infatti, in presenza di un campo magnetico permanente (B_0), i momenti magnetici tendono ad orientarsi nella direzione di B_0 , chiamata, convenzionalmente, direzione longitudinale (z) (Coates et al. 1999). Se un altro campo magnetico (B_1), perpendicolare a B_0 , viene applicato (alla frequenza di risonanza), i momenti magnetici degli atomi vengono forzati a ruotare nel piano trasversale (xy) di B_1 dando origine ad una componente trasversale della magnetizzazione (M_{xy}). Una volta rimosso B_1 , tutti i momenti magnetici tendono a ritornare nella direzione di B_0 cosicché M_{xy} tende a ridursi a favore della componente longitudinale M_z della magnetizzazione che aumenta. Questo fenomeno è noto come rilassamento elettromagnetico e la velocità alla quale si sviluppa viene espressa mediante l'inverso di un tempo caratteristico T_2 (tempo di rilassamento spin-spin) (Brownstein and Tarr 1979). Il decadimento di M_{xy} rispetto al suo valore (massimo) iniziale M_{xy0} , $I(t)$, può essere descritto da una somma di esponenziali, ciascuno caratterizzato da un proprio tempo di rilassamento (T_{2i}) e peso (A_i) che è proporzionale al numero di atomi i cui momenti magnetici rilassano con il tempo T_{2i} (Chui at al. 1995):

$$I(t) = \sum_{i=1}^m A_i e^{(-t/T_{2i})} \quad (11)$$

dove t è il tempo. L'insieme dei tempi di rilassamento e dei relativi pesi costituisce lo spettro di rilassamento magnetico indicato con (A_i, T_{2i}) . Pertanto, è possibile definire il valore medio del tempo di rilassamento (T_{2avg}) ed il suo inverso $((1/T_2)_{avg})$ tramite:

$$T_{2avg} = \sum_{i=1}^m A_i T_{2i} / \sum_{i=1}^m A_i \quad \left(\frac{1}{T_2}\right)_{avg} = \sum_{i=1}^m \frac{A_i}{T_{2i}} / \sum_{i=1}^m A_i \quad A_{i\%} = 100A_i / \sum_{i=1}^m A_i \quad (12)$$

Il numero, m , degli esponenziali è determinato mediante un criterio statistico che prevede la minimizzazione del prodotto $\chi^2 \cdot (2m)$, dove χ^2 è la somma degli scarti quadratici tra l'eq.(11) ed i dati sperimentali e $2m$ rappresenta il numero dei parametri di fitting (le m coppie (A_i, T_{2i}) dell'eq.(11)) (Draper and Smith 1981).

Poiché in prossimità di superfici solide il tempo di rilassamento si riduce notevolmente (la superficie solida si comporta come un assorbitore di magnetizzazione) rispetto a quello che compete ad atomi lontani dalla superficie solida (tempo di rilassamento massivo o libero), lo studio dello spettro dei tempi di rilassamento della fase liquida rende possibile dedurre delle informazioni sull'organizzazione spaziale della fase solida rappresentata, nel caso dell'espessorato, dalla nano-micro struttura polimerica. Nel caso di sistemi polimerici a maglie molto piccole (< 200 nm) come accade nell'espessorato, si può dimostrare che ciascun T_{2i} corrisponde ad una specifica dimensione di maglia ξ_i (Brownstein and Tarr 1979; Chui et al. 1995). Quindi, il decadimento multi-esponenziale è rappresentativo della distribuzione dimensionale delle maglie del reticolo polimerico che pervade il campione. In particolare, la relazione tra tempo di rilassamento e dimensione della maglia è dato da (Chui et al.1995; Abrami, Chiarappa, et al. 2018):

$$\xi_i = \xi \left(\frac{\left(\frac{1}{T_{2i}} - \frac{1}{T_{2H2O}} \right)}{\left(\frac{1}{T_{2avg}} - \frac{1}{T_{2H2O}} \right)} \right) \quad (13)$$

dove T_{2H2O} rappresenta il tempo di rilassamento degli idrogeni dell'acqua *massivo* (ovvero l'acqua lontana dalle catene polimeriche; ≈ 3700 ms a 37°C, 20MHz (Coviello et al. 2013)).

Le misure effettuate con l'NMR a basso campo sono state eseguite mediante un Minispec della Bruker mq20 (0.47 T, Germania) a 37°C. Il valore di T_{2avg} è stato determinato mediante la sequenza CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) (Meiboom and Gill 1958) $90^\circ[-\tau-180^\circ-\tau(\text{echo})]n- T_R$ con $8.36 \mu\text{s}$ di ampiezza per l'impulso a 90° e $\tau=250 \mu\text{s}$ e T_R (intervallo di tempo tra una sequenza CPMG e la ripetizione successiva) pari a 5 s. Poiché i nostri campioni sono caratterizzati da T_{2avg} molto diversi (da 200 a 2000 ms), n non è lo stesso per tutti i campioni. Il criterio adottato per scegliere n consiste nell'assicurarsi che la $I(t)$ finale sia intorno al 2% dell'ampiezza iniziale cosicché non è necessario scegliere $T_R > 5\text{s}$. Ciascun decadimento è stato ripetuto 36 volte (numero di scansioni).

2.3 STRECHED EXPONENTIAL

Al fine di approfondire il confronto tra il rilassamento meccanico-reologico e quello magnetico, le curve di rilassamento magnetico sono state fittate mediante una funzione “stretched exponential”:

$$I(t) = I_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau_M}\right)^{\beta_M}} \quad T_{2M} = \int_0^{\infty} e^{-\left(\frac{t}{\tau_M}\right)^{\beta_M}} dt = \frac{\tau_M}{\beta_M} \Gamma\left(\frac{1}{\beta_M}\right) \quad (14)$$

dove t è il tempo, I_0 indica il valore iniziale di I , τ_M e β_M sono due parametri di fitting che caratterizzano il rilassamento, T_{2M} è il tempo di rilassamento medio mentre Γ indica la funzione gamma. Similmente, il processo di rilassamento meccanico-reologico, deducibile dallo spettro di rilassamento (g_i, λ_i) ottenuto fittando il modello di Maxwell generalizzato (eq.(1) e (2)) sui dati di frequency sweep:

$$G(t) = \sum_{i=1}^{n_R} g_i e^{-\frac{t}{\lambda_i}} \quad G_0 = \sum_{i=1}^{n_R} g_i \quad \lambda_R = \sum_{i=1}^{n_R} \frac{g_i \lambda_i}{G_0} \quad (15)$$

Può essere descritto mediante una funzione “stretched exponential”:

$$G(t) = G_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau_R}\right)^{\beta_R}} \quad T_R = \int_0^{\infty} e^{-\left(\frac{t}{\tau_R}\right)^{\beta_R}} dt = \frac{\tau_R}{\beta_R} \Gamma\left(\frac{1}{\beta_R}\right) \quad (16)$$

dove G_0 è il valore iniziale del modulo di taglio G , mentre i parametri τ_R , β_R e T_R hanno lo stesso significato degli analoghi parametri che compaiono nell’eq.(14).

2.4 ANALISI STATISTICA

La natura della distribuzione dei dati (normale o meno) è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov (KS-test). Basandosi su tale test, il coefficiente di correlazione di Spearman (r_{sp}) è stato considerato per verificare l’esistenza o meno di una correlazione diretta/inversa tra i diversi parametri misurati o dedotti.

3 RISULTATI

Per una miglior comprensione dei dati, si è deciso di riportare in **Figura 2A** solamente le curve di flusso relative ai campioni caratterizzati dai valori più alti (MAX) e più bassi (MIN) della viscosità a zero shear ed a shear infinito. Infatti, tutti i campioni esaminati, pur differenziandosi per i due valori asintotici delle due viscosità, hanno comportamenti qualitativamente simili. Si può notare che siamo in presenza di fluidi non newtoniani (shear thinning) caratterizzati da valori della viscosità a zero-shear nettamente superiori a quelli che competono all'espettorato (sostanzialmente saliva, comportamento newtoniano) di soggetti sani ($\approx 10^{-3}$ Pa*s). Ciò è in accordo con tutte le evidenze di letteratura circa il comportamento in flusso del muco di soggetti sani (Dawson et al. 2003; Lai et al. 2009) e pazienti CF (Zahm et al. 1998). In aggiunta, la **Figura 2A** evidenzia che il comportamento shear thinning può essere descritto dal modello di Cross (linee continue). È interessante notare che, in condizioni di shear fisiologici ($10^{-1} - 10^2$ 1/s), i valori di viscosità dei campioni analizzati sono compresi tra 10^1 e 10^3 Pa s, ovvero all'interno del range sperimentale misurato da Zahm e collaboratori (Zahm et al. 1998)

Le prove di stress sweep, indicano, in accordo con quanto trovato da Tan e collaboratori (Tan et al. 2020), che il regime viscoelastico lineare si estende fino a valori di deformazione intorno al 10%. Pertanto, le prove di *frequency sweep* sono state condotte fissando $\gamma_0 = 0.05$. Per motivi di chiarezza, la **Figura 2B** riporta solamente lo spettro meccanico dei campioni MIN e MAX di **Figura 2A**, visto che tutti gli altri campioni hanno uno spettro meccanico simile, seppur caratterizzato da diversi valori di G' e G'' nell'intervallo di pulsazione indagato. Poiché in ambedue i campioni G' risulta essere maggiore di G'' per qualunque ω (sebbene la prevalenza non sia netta, ovvero $G'' < G' < 10 G''$), possiamo concludere che le proprietà elastiche degli espectorati prevalgono su quelle viscosive. Infine, poiché, G' e G'' risultano solo debolmente dipendenti dalla pulsazione ω , i campioni esaminati si possono collocare nella ampia categoria dei gel deboli. L'analisi (fitting) degli

spettri meccanici mediante il modello di Maxwell generalizzato (eq.(1) e (2) - linee continue di **Figura 2B**) ha permesso di valutare il modulo di taglio G_0 e da questo, mediante la teoria di Flory (eq.(3)) e la teoria del network equivalente (eq.(4)), dedurre, rispettivamente, la densità di reticolazione (ρ_x) e la dimensione media delle maglie (ξ) del reticolo polimerico che pervade l'espettorato, come evidenziato in **Tabella 1**.

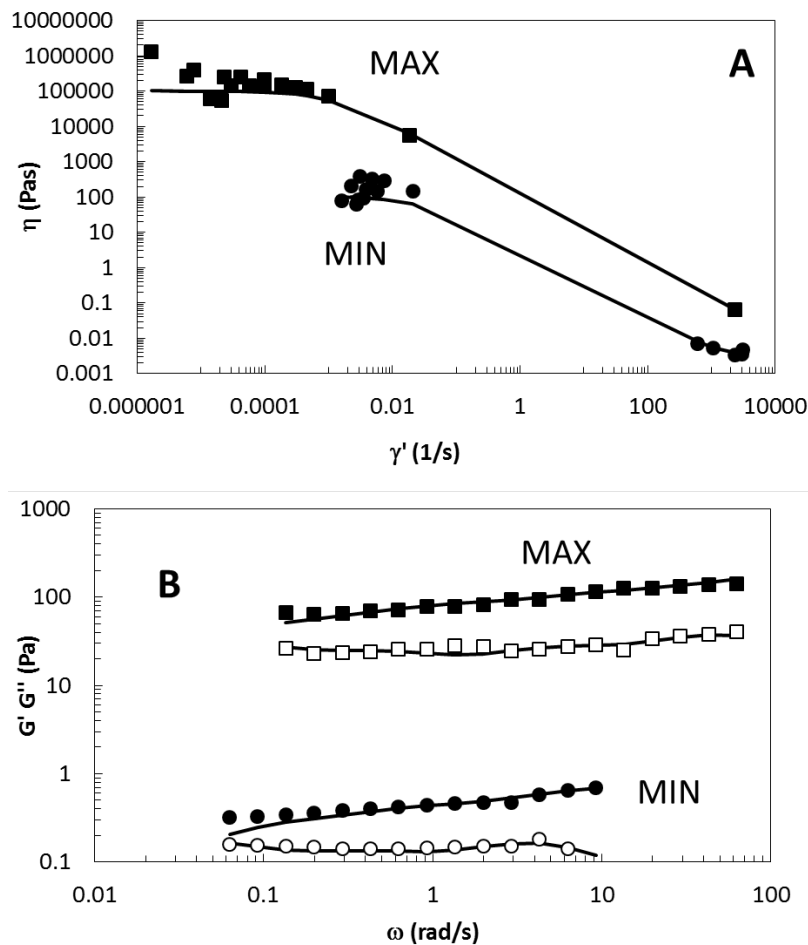


Figura 2A. Curva di flusso relativa ai due campioni caratterizzati dai valori di viscosità massimi (MAX -rombi) e minimi (MIN - pallini). Le linee continue indicano il best fitting del modello di Cross (eq.(10)). η indica la viscosità e $\dot{\gamma}'$ la velocità di deformazione. **2B)** Spettro meccanico dei campioni MIN e MAX: G' (simboli pieni) indica il modulo elastico, G'' (simboli vuoti) indica il modulo viscoso mentre ω indica la pulsazione ($=2\pi f$). Le linee continue indicano il best fitting del modello di Maxwell (eq.(1)-(2)).

La caratterizzazione dei campioni è, infine, completata dall'analisi NMR che restituisce il tempo di rilassamento medio (T_{2avg}) degli idrogeni dell'acqua intrappolata nel reticolo polimerico dell'espettorato.

Tabella 1. Valori dei parametri di fitting del modello di Cross (η_0 , η_∞ , λ_c , n ; eq.(10)) e del modello di Maxwell generalizzato (g_i , λ_i ; eq.(1) e (2)) relativi ai dati riportati in **Figura 2**. ρ_x è la densità di reticolazione (eq.(3)), G_0 è il modulo di taglio, ξ è la dimensione media delle maglie (eq.(4)) mentre λ_R e T_R sono i tempi di rilassamento meccanici medi valutati, rispettivamente, secondo le eq.(15) e (16).

MAX										
η_0 (Pa)	η_∞ (Pa)	λ_c (s)	n (-)	λ_i (s)	g_i (Pa)	ρ_x (mole/m ³)	G_0 (Pa)	ξ (nm)	λ_R (s)	T_R (s)
97263	0.065	325	1.58	1.9*10 ⁻² 1.9*10 ⁻¹ 1.9*10 ⁰ 1.9*10 ¹	67.5 34.8 29.4 56.7	7.6*10 ⁻²	188.5	34	6	16
MIN										
η_0 (Pa)	η_∞ (Pa)	λ_c (s)	n (-)	λ_i (s)	g_i (Pa)	ρ_x (mole/m ³)	G_0 (Pa)	ξ (nm)	λ_R (s)	T_R (s)
99.5	0.0035	0.71	1.7	2.6*10 ⁻¹ 2.6*10 ⁰ 2.6*10 ¹	0.29 0.14 0.32	3.1*10 ⁻⁴	0.76	218	12	21

Tale parametro, come discusso nella sezione 2.2, diminuisce con la gravità delle condizioni cliniche del paziente in quanto indice di un muco più disidratato, caratterizzato da una più alta concentrazione polimerica che, a sua volta, si riflette in valori più piccoli della dimensione media delle maglie del reticolo polimerico costituente la nano struttura dell'espettorato. La **Tabella 2** riporta, per i campioni di **Figura 2**, i valori di T_{2avg} e gli spettri di rilassamento magnetico dati dalle coppie (T_{2i} ; A_i). Data la maggior elasticità, non stupisce che il campione MAX sia caratterizzato da un T_{2avg} inferiore di un ordine di grandezza rispetto a quello che compete al campione MIN.

Tabella 2. Spettri di rilassamento magnetico (T_{2i} , A_i) e tempi medi di rilassamento magnetico (T_{2avg} , eq.(12); T_{2M} , eq.(14)) relativi ai campioni riportati in **Figura 2**.

MAX				
A_i (%)	T_{2i} (ms)	T_{2avg} (ms)	T_{2M} (ms)	$(1/T_{2i})_{avg}$ (ms ⁻¹)
9	1909	292	130	9.1*10 ⁻³
19	275			
62	102			
10	45			
MIN				
A_i (%)	T_{2i} (ms)	T_{2avg} (ms)	T_{2M} (ms)	$(1/T_{2i})_{avg}$ (ms ⁻¹)
35	2876	1870	1748	6.1*10 ⁻⁴
65	1330			

In aggiunta, la necessità di 4 T_{2i} per descrivere il rilassamento magnetico indica una struttura interna più disomogenea (complessa) rispetto a quella del campione MIN per il quale sono sufficienti 2 tempi.

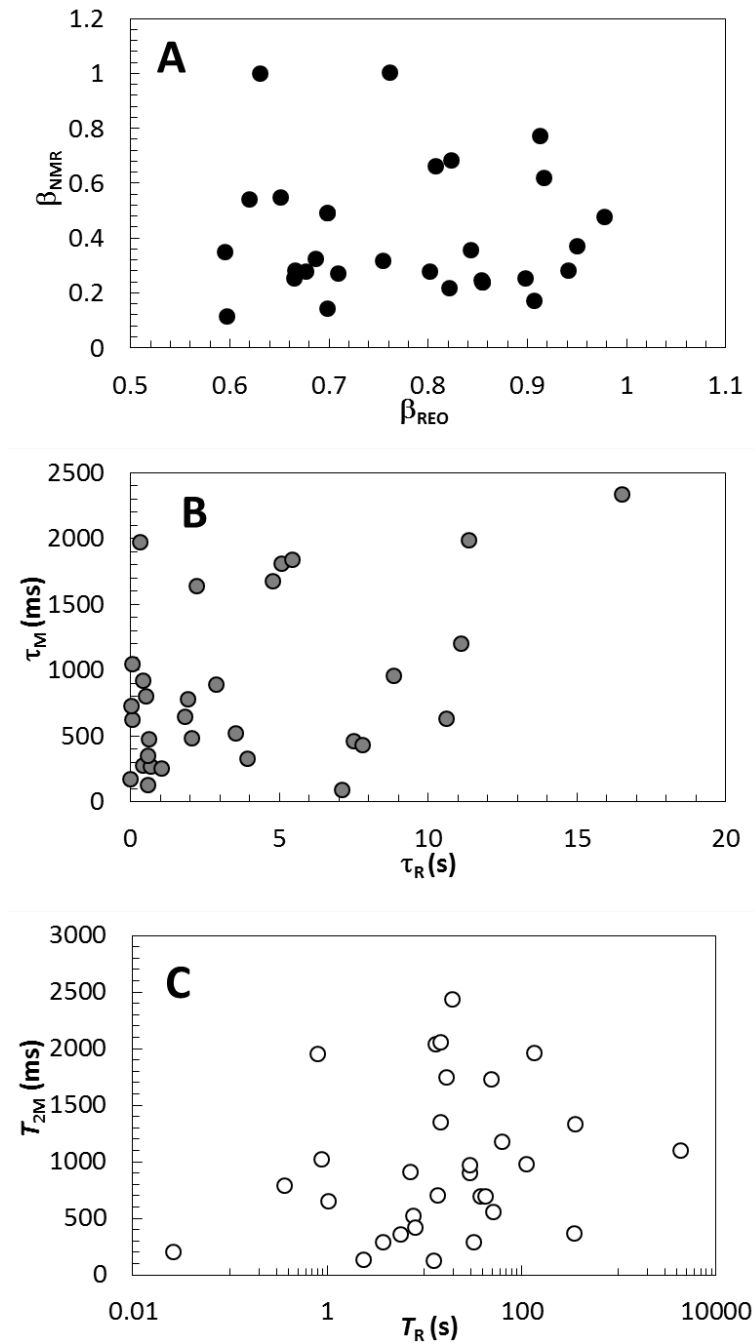


Figura 3. A) correlazione non significativa tra β_M e β_R , **B)** correlazione non significativa tra τ_M e τ_R , **C)** correlazione non significativa tra T_{2M} e T_R . Le correlazioni sono state valutate mediante il coefficiente di Spearman.

Per meglio comparare la caratterizzazione reologica e quella LF-NMR, abbiamo ritenuto utile scegliere il “rilassamento” come terreno di confronto in quanto ambedue le tecniche danno

informazioni su questo aspetto, la reologia fornendo indicazioni sul rilassamento meccanico e il LF-NMR studiando il rilassamento magnetico. Sebbene tale confronto possa essere condotto sulla base dei parametri delle eq.(15) e (11), sembra più semplice ricorrere alle equazioni (14) e (16) che imbrigliano in due soli parametri (β e τ) le caratteristiche salienti dei due rilassamenti. Infatti, i valori di T_{2M} (eq.(14)), sebbene non coincidenti con quelli di T_{2avg} (eq.(12)), ne seguono il trend rispetto ai vari pazienti. Analogamente dicasi per i valori di T_R (eq.(16)) rispetto a quelli di λ_R (eq.(15)). Dunque, si sono cercate eventuali correlazioni tra le coppie di parametri β_M e β_R , τ_M e τ_R , T_{2M} e T_R , i cui valori sono riportati nelle **Figure 3A, 3B e 3C**. L'assenza di correlazione tra i parametri riferiti al rilassamento magnetico ed a quello meccanico-reologico indica che i due fenomeni non sono analoghi e sono, quindi, governati da meccanismi diversi. Ciò non è sorprendente in quanto, nel caso del LF-NMR, il rilassamento del momento magnetico degli idrogeni dell'acqua è dettato dall'area della superficie che la fase solida (catene polimeriche) espone alle molecole di acqua. A sua volta, l'entità di tale superficie dipende dalla concentrazione della fase solida e dalla sua architettura spaziale nell'espessorato. Invece, per quanto riguarda la reologia, quello che conta sono le proprietà elastiche delle catene polimeriche congiuntamente al numero ed alla natura dei punti (o, zone) di reticolazione tra catene diverse. Un campione molto concentrato in cui i punti di reticolazione tra diverse catene sono pochi e/o deboli sarà caratterizzato da un basso T_{2avg} ed un basso modulo di taglio.

Poiché, dunque, i fenomeni di rilassamento meccanico-reologico e magnetico differiscono l'un l'altro, le due caratterizzazioni rilevano diversi aspetti della struttura dell'espessorato, potendosi integrare sinergicamente per dare una visione molto più chiara di quanto non potrebbe fare ciascuna delle due tecniche presa singolarmente. Il primo interessante punto di contatto consiste nella correlazione inversa tra T_{2avg} ed ambedue le grandezze reologiche G_0 ($r = -0.57$, $p = 3 \cdot 10^{-3}$) ed η_0 ($r = -0.48$, $p = 1.7 \cdot 10^{-2}$) (Abrami et al. 2020, sottomesso). A nostro avviso, la ragione di tale

correlazione risiede nel fatto che, pur essendo influenzati da diversi aspetti, i tre suddetti parametri dipendono, comunque, dalle caratteristiche dall'architettura del reticolo polimerico che pervade l'espettorato. Il secondo, ed ancora più interessante punto sinergico, consiste nella correlazione tra T_{2avg} e gli indici MCI e CCI , valutabili sulla base delle prove di frequency sweep. Infatti, nostri recenti studi rivelano (Abrami et al. 2020, sottomesso) l'esistenza di una significativa correlazione diretta tra T_{2avg} ed entrambi gli indici (correlazione $T_{2avg} - MCI$: $r = 0.51$ $p = 3.6 \cdot 10^{-3}$; correlazione $T_{2avg} - CCI$: $r = 0.38$ $p = 3.4 \cdot 10^{-2}$). Ciò è ragionevole, poiché l'aumento di T_{2avg} implica una riduzione della concentrazione delle componenti solide e/o un deterioramento della connettività del reticolo tridimensionale che pervade il volume dell'espettorato. Dunque, un aumento di T_{2avg} dovrebbe essere connesso con un miglioramento delle condizioni cliniche del paziente. Tale interpretazione è supportata dall'esistenza di una significativa correlazione diretta tra FEV_1 e MCI ($r = 0.64$, $p = 4.0 \cdot 10^{-4}$) e tra FEV_1 e CCI ($r = 0.64$, $p = 5.0 \cdot 10^{-4}$). Infatti, maggiore è FEV_1 , migliori sono le condizioni cliniche del paziente. L'interessante conclusione che si può trarre da queste evidenze è che il complesso effetto delle proprietà viscoelastiche degli espettorati, rappresentate da MCI e CCI ed indissolubilmente legate allo stato dei polmoni, ovvero allo stato clinico del paziente, può essere riassunto dal solo parametro T_{2avg} .

Il terzo punto alla base della sinergia esistente tra reologia e LF-NMR si concretizza nella possibilità di usare le informazioni derivanti dalle due caratterizzazioni per stimare la distribuzione dimensionale delle maglie del reticolo polimerico che pervade l'espettorato dei pazienti. Sebbene, in teoria, la caratterizzazione LF-NMR sarebbe autonomamente in grado di stimare tale caratteristica, ciò non è indicato nel caso dell'espettorato. Infatti, l'ipotesi fondamentale sulla quale si basa l'approccio LF-NMR, ovvero l'esistenza di un reticolo polimerico costituito da catene polimeriche dello stesso tipo approssimabili a lunghi cilindri di raggio noto, non si addice al caso dell'espettorato in cui un reticolo interpenetrato, costituito da catene polimeriche diverse tra di

loro e non schematizzabili mediante cilindri, ne pervade l'intero volume. Pertanto, a titolo di esempio, per i sistemi "MIN" e "MAX", le cui caratteristiche reologiche e LF-NMR sono riportate, rispettivamente, in **Figura 2 - Tabella 1 e Tabella 2**, si è valutata la distribuzione dimensionale delle maglie mediante l'eq.(13) in cui la dimensione media (ξ) è stata ottenuta rifacendosi all'approccio reologico (eq.(3) e (4)), mentre la caratterizzazione LF-NMR ha fornito $(1/T_2)_{avg}$ e T_{2i} . Per avere una distribuzione continua, si è usata l'eq.(11) suddividendo, in maniera logaritmica, l'intervallo dei tempi di rilassamento (0.1 - 10000 ms) in $m = 200$ parti, lasciando ai soli A_i il ruolo di parametri di fitting (Abrami et al. 2018). Questo modo di procedere, pur permettendo di ottenere una distribuzione continua dei tempi di rilassamento (T_{2i}) e, dunque, delle dimensioni delle maglie (ξ_i), fornisce un risultato qualitativamente simile a quello che perviene dall'approccio presentato nella sezione 2.2 e volto alla determinazione della distribuzione discreta dei T_{2i} , ovvero degli ξ_i , come evidenziato in **Figura 4**.

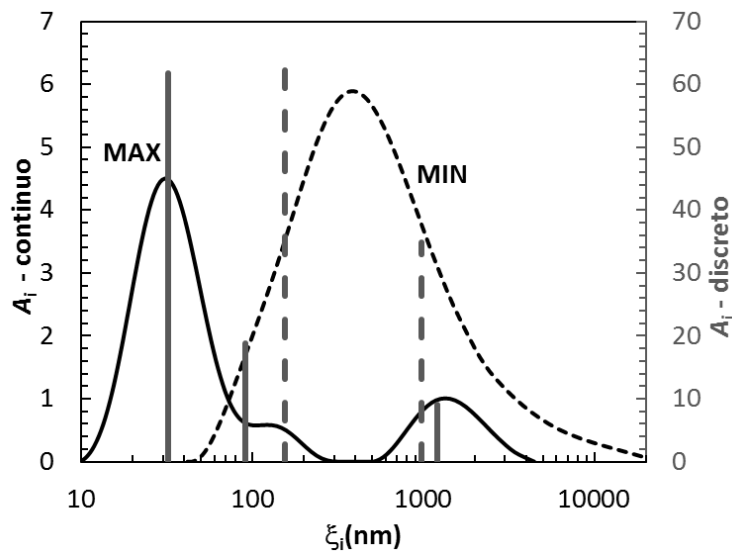


Figura 4. Distribuzioni dimensionali (ξ_i) continue delle maglie (A_i -continuo, asse verticale sinistro) riferentesi ai campioni denominati MIN (linea nera tratteggiata) e MAX (linea nera continua), le cui caratteristiche reologiche e LF-NMR sono riportate, rispettivamente, in **Figura 2 - Tabella 1 e Tabella 2**. Le linee verticali grigie indicano le distribuzioni discrete (A_i -discreto, asse verticale destro) relative ai sistemi MIN (linea tratteggiata) e MAX (linea continua).

Infatti, focalizzando, per esempio, l'attenzione sul sistema MAX, si vede che la distribuzione continua delle dimensioni delle maglie (curva continua – A_i continuo, asse verticale sinistro) è in

accordo con quella discreta (linee continue verticali grigie– A_i discreto, asse verticale destro). Lo stesso dicasi per il sistema MIN, in cui le distribuzioni continua e discreta sono rappresentate da due linee tratteggiate nera e grigia, rispettivamente. Il vero vantaggio della distribuzione continua rispetto a quella discreta consiste nel poter meglio valutare il significato dei vari picchi che la costituiscono. Infatti, ricordando che nel muco di soggetti sani le dimensioni delle maglie del reticolo polimerico (mucine interpenetrate) variano tra 100 e 500 nm (Hill et al. 2014; Matsui et al. 2006; Duncan et al. 2016), possiamo ragionevolmente concludere che il picco a 10^3 nm del campione MAX, altro non sia che acqua “libera”, ovvero quella frazione di acqua che non sta nel reticolo polimerico ma che si trova tra le parti di muco reticolate. Analogo ragionamento si può fare per il sistema MIN in cui si vede chiaramente che la “coda” che si estende tra i 10^3 nm e i 10^4 nm non può che essere acqua libera presente tra le zone di espettorato reticolate. In ambedue i casi (MIN e MAX), si può ipotizzare che la frazione di acqua libera sia da imputarsi ad una contaminazione dovuta alla saliva. Tuttavia è bene sottolineare che tale contaminazione, pur variando il valore numerico del T_{2avg} , non altera il risultato qualitativo dell’analisi fatta mediante LF-NMR. Infatti, il campione MAX, caratterizzato da $T_{2avg} = 292$ ms, risulta essere costituito da un reticolo in cui una notevole frazione di maglie ($\approx 85\%$) rientrano, per dimensioni, in un campo patologico (< 100 nm). Al contrario, nel campione MIN ($T_{2avg} = 1870$ ms), tale percentuale è solo del 9%, ovvero un ordine di grandezza inferiore. Considerato che i valori normali del FEV_1 variano, circa, da 90 a 110 e che FEV_1 è pari a 40 e 78, rispettivamente, per i campioni MAX e MIN, possiamo concludere, in linea con quanto deducibile dalla stima del T_{2avg} , che le condizioni cliniche del paziente MAX siano molto peggiori di quelle del paziente MIN che si avvicina ad una condizione di normalità.

Infine, bisogna ricordare che la stima del mesh size riveste di grande utilità in quanto è ben noto che la diffusione di farmaci all’interno di sistemi gel dipende dal rapporto tra il raggio della

molecola del farmaco e ξ (Lustig and Peppas 1988; Abrami et al. 2019). Minore è tale rapporto, maggiore sarà l'accessibilità del farmaco nel muco e, pertanto, più alta sarà la sua disponibilità ed efficacia.

4 CONCLUSIONI

Poiché il rilassamento reologico-meccanico e quello magnetico non sono correlati, in quanto governati da diversi fenomeni fisici, le caratterizzazioni reologica e LF-NMR permettono di determinare aspetti diversi della struttura polimerica dell'espettorato di pazienti affetti da fibrosi cistica. In particolare, l'uso delle due tecniche risulta sinergico nella caratterizzazione della nanostruttura dell'espettorato fornendone una descrizione che nessuno dei due approcci, preso singolarmente, potrebbe dare. Infatti, non solo abbiamo potuto verificare che il tempo di rilassamento medio T_{2avg} è correlato con il modulo di taglio G_0 e la viscosità a zero shear η_0 , ma abbiamo potuto anche osservare la correlazione tra T_{2avg} e i due indici *MCI* (*mucoiliary clearability index*) e *CCI* (*cough clearability index*), rappresentativi, rispettivamente, della rimozione del muco mediante azione delle ciglia cellulari e dei colpi di tosse, ovvero i due principali meccanismi per movimentare il muco nelle vie aeree. Questa evidenza permette di concludere che il parametro T_{2avg} è rappresentativo dei complessi aspetti reologici coinvolti nella movimentazione del muco polmonare, fatto di fondamentale importanza per la funzionalità e la salute polmonare. Infine, poiché T_{2avg} non è solo influenzato dalla concentrazione polimerica ma, anche, dall'organizzazione spaziale delle catene polimeriche, l'uso combinato della reologia e dell'LF-NMR permette di determinare la distribuzione dimensionale delle maglie del complesso reticolo polimerico che pervade l'espettorato di pazienti affetti da fibrosi cistica. Tale caratteristica è molto importante in quanto strettamente connessa con l'efficacia clinica dei farmaci usati nella terapia per la fibrosi

cistica (ad es. fluidificanti, anti-infiammatori ed antibiotici), visto che regola la diffusione del farmaco all'interno del muco.

Sebbene, grazie alla sua rapidità e semplicità, la determinazione di T_{2avg} , rappresenti un buon approccio per guidare le decisioni cliniche, la necessità di ottenere maggiori informazioni sulla struttura dell'espettorato richiede l'aiuto della caratterizzazione reologica per estrarre informazioni implicitamente contenute del T_{2avg} .

5 RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato avvalso del finanziamento della Società italiana di Reologia – SIR- Italia e della Fondazione Cassa di Risparmio di Trieste, Italia.

6 BIBLIOGRAFIA

- Abrami M, Maschio M, Conese M, Confalonieri M, Gerin F, Dapas B, Farra R, Adrover A, Torelli L, Grassi G, Grassi M (2020) Combined use of Rheology and portable Low-Field NMR in cystic fibrosis patients. Eur Respir J (submitted)*
- Abrami M, Ascenzioni F, Di Domenico EG, Maschio M, Ventura A, Confalonieri M, Di Gioia S, Conese M, Dapas B, Grassi G, Grassi M. (2018). A novel approach based on low-field NMR for the detection of the pathological components of sputum in cystic fibrosis patients. Magn Reson Med 79:2323–2331. doi:10.1002/mrm.26876*
- Abrami M, Chiarappa G, Farra R, Grassi G, Marizza P, Grassi M (2018). Use of low-field NMR for the characterization of gels and biological tissues. ADMET and DMPK 6:34-46. doi:10.5599/admet.6.1.430*
- Abrami M, Maschio M, Conese M, Confalonieri M, Di Gioia S, Gerin F, Dapas B, Tonon F, Farra R, Murano E, Zanella G, Salton F, Torelli L, Grassi G, Grassi M (2020) Use of low field nuclear magnetic resonance to monitor lung inflammation and the amount of pathological components in the sputum of cystic fibrosis patients. Magne Reson Med 84:427–436 doi:10.1002/mrm.28115*
- Abrami M, Marizza P, Zecchin F, Bertocin P, Marson D, Lapasin R, De Riso F, Posocco P, Grassi G, Grassi M (2019). Theoretical Importance of PVP-Alginate Hydrogels Structure on Drug Release Kinetics. Gels 5:1-15 doi:10.3390/gels5020022*
- App EM, Kieselmann R, Reinhardt D, Lindemann H, Dasgupta B, King M, Brand P (1998) Sputum*

rheology changes in cystic fibrosis lung disease following two different types of physiotherapy: Flutter vs autogenic drainage. Chest 114:171-177 doi:10.1378/chest.114.1.171

Boucher RC (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Eur Respir J 23:146-158 doi:10.1183/09031936.03.00057003

Brownstein KR, Tarr CE (1979) Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. Phys Rev A 19:2446-2453 doi:10.1103/PhysRevA.19.2446

Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF (2015) Inflammation in cystic fibrosis lung disease : Pathogenesis and therapy. J Cyst Fibros, 14:419–430 doi:10.1016/j.jcf.2015.03.003

Chui MM, Phillips RJ, McCarthy MJ (1995) Measurement of the porous microstructure of hydrogels by nuclear magnetic resonance. J Colloid Interface Sci 174:336-344 doi: 10.1006/jcis.1995.1399

Coates GR, Xiao L, Prammer MG (1999) NMR-Logging Raw Data in: NMR Logging Principles and Applications. Elsevier Science, University of Michigan, pp 6-9

Cone RA (2009) Barrier properties of mucus. Adv Drug Deliv Rev 61:75–85 doi:10.1016/j.addr.2008.09.008

Coviello T, Matricardi P, Alhaique F, Farra R, Tesi G, Fiorentino S, Asaro F (2013) Guar gum / borax hydrogel : Rheological , low field NMR and release characterizations. Express Polym Lett 7:733–746 doi:10.3144/expresspolymlett.2013.71

Cross MM (1965) Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. J Colloid Sci 20:417-437 doi:10.1016/0095-8522(65)90022-X

Dawson M, Wirtz D, Hanes J (2003) Enhanced Viscoelasticity of Human Cystic Fibrotic Sputum Correlates with Increasing Microheterogeneity in Particle Transport. J Biol Chem 278:50393–50401 doi:10.1074/jbc.M309026200

Draper NR, Smith H (1981) Applied Regression Analysis, 2 ed. Wiley, New York

Duncan GA, Jung J, Joseph A, Thaxton AL, West NE, Boyle MP, Hanes J, Suk JS (2016) Microstructural alterations of sputum in cystic fibrosis lung disease. JCI Insight <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88198> Accessed 3rd November 2016

Ehre C, Ridley C, Thornton DJ (2014) An inherited disease affecting mucin-producing organs. Int J Biochem Cell B 52:136–145 doi:10.1016/j.biocel.2014.03.011

Flory PJ (1953) The Thermodynamics of Polymer Solutions. In Principles of Polymer Chemistry Ithaca, NY, Cornell University Press.

Fung C, Naughton S, Turnbull L, Tingpej P, Rose B, Arthur J, Hu H, Harmer C, Harbour C, Hassett DJ, Whitchurch CB, Manos J (2010) Gene expression of Pseudomonas aeruginosa in a mucin-containing synthetic growth medium mimicking cystic fibrosis lung sputum. J Med Microbiol 59:1089–1100 doi:10.1099/jmm.0.019984-0

Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Houtmeyers E, de Paepe K, Decramer M (2006) High-dose lidocaine

reduces airway mucus transport velocity in intubated anesthetized dogs. *Respir Med* 100:258-263 doi: 10.1016/j.rmed.2005.04.028

Henderson AG, Ehre C, Button B, Abdullah LH, Cai LH, Leigh MW, DeMaria GC, Matsui H, Donaldson SH, Davis CW, Sheehan JK, Boucher RC, Kesimer M (2014) Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J Clin Invest* 124:3047–3060 doi:10.1172/JCI73469

Hill DB, Long RF, Kissner WJ, Atieh E, Garbarine IC, Markovetz MR, Fontana NC, Christy M, Habibpour M, Tarran R, Forest MG, Boucher RC, Button B (2018) Pathological mucus and impaired mucus clearance in cystic fibrosis patients result from increased concentration, not altered pH. *Eur Respir J* 52:1-11 doi:10.1183/13993003.01297-2018

Hill DB, Vasquez PA, Mellnik J, Mckinley SA, Vose A, Mu F, Henderson AG, Donaldson SH, Alexis NE, Boucher RC, Forest MG (2014) A Biophysical Basis for Mucus Solids Concentration as a Candidate Biomarker for Airways Disease. *PLoS ONE* 9:1–11 doi:10.1371/journal.pone.0087681

Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080 doi:10.1126/science.2570460

King M (1987) Role of mucus viscoelasticity in clearance by cough. *Eur J Respir Dis* 153:165-72 doi: 10.3233/bir-1987-24611

King M (1998) Experimental models for studying mucociliary clearance. *Eur Respir J* 11:222-228 doi:10.1183/09031936.98.11010222

King M, Brock G, Lundell C (1985) Clearance of mucus by simulated cough. *J Appl Physiol* 58:1776-1782 doi:10.1152/jappl.1985.58.6.1776

Lai SK, Wang YY, Wirtz D, Hanes J (2009) Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61:86-100 doi:10.1016/j.addr.2008.09.012

Lapasin R, Prisci S (1998) Rheology of Biopolymer Gel Systems In: *Progress and Trends in Rheology* 22-25 doi:10.1007/978-3-642-51062-5_8

Lustig SR, Peppas NA (1988) Solute diffusion in swollen membranes IX Scaling laws for solute diffusion in gels. *J Appl Polym Sci* 36:735-747 doi:10.1002/app.1988.070360401

Ma JT, Tang C, Kang L, Voynow JA, Rubin BK (2018) Cystic Fibrosis Sputum Rheology Correlates With Both Acute and Longitudinal Changes in Lung Function. *Chest* 154:370-377 doi:10.1016/j.chest.2018.03.005

Manzenreiter R, Kienberger F, Marcos V, Schilcher K, Krautgartner WD, Obermayer A, Huml M, Stoiber W, Hector A, Griese M, Hannig M, Studnicka M, Vitkov L, Hartl D (2012) Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J Cys Fibr* 11:84–92 doi:10.1016/j.jcf.2011.09.008

Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, Taylor II MT, Superfine R, Michael

- Rubinstein, Iglewski BH, Boucher RC (2006) A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PNAS* 103:18131-18136 doi:10.1073/pnas.0606428103
- Meiboom S, Gill D (1958) Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instr* 29:688-691 doi:10.1063/1.1716296
- Nettles C, Jenkins L, Daniels R, Williams R, Lewis K (2014) Feasibility of measuring sputum rheology in COPD. *Eur Respir J* 54:67-80 doi: 10.3233/BIR-17141
- Radtke T, Böni L, Bohnacker P, Fischer P, Benden C, Dressel H (2018) The many ways sputum flows – Dealing with high within-subject variability in cystic fibrosis sputum rheology. *Respir Physiol Neurobiol* 254:36–39 doi:10.1016/j.resp.2018.04.006
- Reeves EP, Molloy K, Pohl K, McElvaney NG (2012) Hypertonic saline in treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Sci World J* 2012:1-11 doi:10.1100/2012/465230
- Rubin BK (2007) Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 8:4-7 doi:10.1016/j.prrv.2007.02.004
- Schurz J (1991) Rheology of polymer solutions of the network type. *Prog Polym Sci* 6:1-53 doi:10.1016/0079-6700(91)90006-7
- Serisier DJ, Carroll MP, Shute JK, Young SA (2009) Macrorheology of cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease & normal sputum. *Respir Res* 10:1–8 doi:10.1186/1465-9921-10-63
- Tan M, Mao Y, Walker TW (2020) Rheological enhancement of artificial sputum medium. *App Rheol* 30:27–38 doi:10.1515/ARH-2020-0100
- Tildy BE, Rogers DF (2015) Therapeutic options for hydrating airway mucus in cystic fibrosis. *Pharmacology* 95:117-132 doi:10.1159/000377638
- Tomaiuolo G, Rusciano G, Caserta S, Carciati A, Carnovale V, Abete P, Sasso A, Guido S (2014). A New Method to Improve the Clinical Evaluation of Cystic Fibrosis Patients by Mucus Viscoelastic Properties. *PLOSE ONE* 9:1–13 doi:10.1371/journal.pone.0082297
- Welsh MJ (2015) Origins of Cystic Fibrosis Lung Disease. *N Engl J Med* 372:351-362 doi:10.1056/NEJMr1300109
- Zahm JM, Galabert C, Chaffin A, Chazalette JP, Grosskopf C, Puchelle E (1998) Improvement of cystic fibrosis airway mucus transportability by recombinant human DNase is related to changes in phospholipid profile. *Am J Respir Crit* 157:1779–1784 doi:10.1164/ajrccm.157.6.9706036