

La determinazione del paratormone (PTH) nel liquido colturale: nuove applicazioni nella gestione dell'iperparatiroidismo

Giulia Valle¹, Giulia Montesano¹, Giulia Gioiello¹, Lucrezia Massobrio¹, Gabriella Priolo¹, Giovanna Martinasso¹, Piera Santoro², Erica Falzarano², Federico Genzano Besso², Giulio Mengozzi¹

¹SC Biochimica Clinica "Baldi e Riberi",

²SSD Banche Tessuti e Bioconservatorio,

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AOU Città della Salute e della Scienza, Torino

Il presente contributo è derivato dal poster che è stato selezionato fra quelli presentati in occasione del Simposio LIGAND ASSAY 2022 per l'assegnazione del premio ELAS Italia

RIASSUNTO *Introduzione.* il trattamento iniziale dell'iperparatiroidismo consiste in terapie mediche atte a rallentare lo sviluppo della patologia e a prevenirne le complicazioni. Spesso diventa necessario l'intervento di paratiroidectomia, che può portare, a distanza di mesi o anni, allo sviluppo di ipoparatiroidismo postchirurgico a causa dell'insufficienza funzionale del tessuto paratiroidico residuo. Una terapia risolutiva sembra essere l'autotrapianto differito di frammenti di tessuto paratiroidico prelevati durante la paratiroidectomia e crioconservati per periodi più o meno lunghi. La crioconservazione assicura il mantenimento a lungo termine dei frammenti tissutali paratiroidici, ma è fondamentale effettuare test di funzionalità per selezionare quelli più adeguati all'autotrapianto. **Materiali e metodi.** In questo studio, è stata valutata la funzionalità del tessuto paratiroidico di 30 pazienti sottoposti a paratiroidectomia, i cui frammenti sono stati crioconservati e poi scongelati per un eventuale autotrapianto. Sono stati scongelati 6 frammenti di tessuto per paziente e questi sono stati incubati in 3 terreni colturali diversi (M1 basale, M1 + 0.6 mM calcio gluconato, M1 + 1.2 mM calcio gluconato) al fine di valutare la funzionalità in base alla quantità di PTH rilasciato. Il terreno colturale per la determinazione dei livelli di PTH è stato prelevato dopo 24 e 48 ore. Utilizzando un metodo modificato home-made, è stata valutata la precisione, la ripetibilità e la diluizione della metodica su matrice non convenzionale. Due campioni con basse e alte concentrazioni di PTH sono stati frazionati in 14 aliquote per le prove. I campioni derivati da tessuto paratiroidico crioconservato sono stati analizzati con il test LIAISON PTH Assay (Diasorin, Saluggia - VC). **Risultati.** Il metodo adattato home-made ha mostrato un CV% medio di 3,2 nella stessa serie e 6,2 nelle valutazioni tra le serie. Nel test di diluizione tutti i campioni evidenziano una tendenza alla sottostima dei valori di PTH ottenuti rispetto a quelli attesi. I campioni di tessuto paratiroidico crioconservato sono stati controllati per funzionalità *ex vivo* e vitalità residua, misurando la concentrazione di PTH a 24 e 48 ore dallo scongelamento, con una media rispettivamente di 2357,6 ng/L e 2128,3 ng/L ($p = 0,76$). La concentrazione di PTH è aumentata a 2527,5 ng/L con calcio 0,6 mM e diminuita a 1639,2 ng/L dopo 24 ore con 1,2 mM di calcio gluconato. Dopo 48 ore, il PTH è sceso a 1098,12 ng/L con 0,6 mM e a 932,45 ng/L con 1,2 mM di calcio gluconato. **Conclusioni.** Dallo studio emerge che solo nel 36,7% dei pazienti sia possibile dimostrare una risposta corretta al calcio, con aumento di PTH alla concentrazione di 0,6 mmol/L e riduzione con 1,2 mmol/L, mentre il rimanente 63,3 % dei pazienti ha perso questa capacità. Questi risultati sottolineano l'importanza di una valutazione accurata e mirata della funzionalità dei tessuti prima dell'autotrapianto, per garantire risultati ottimali nel trattamento dell'ipoparatiroidismo postchirurgico. Questo lavoro ha permesso di dimostrare l'importanza di poter utilizzare un test diagnostico analiticamente valido, ripetibile e attendibile in grado di fornire informazioni utili riguardo al tessuto che si intende re-impiantare nel paziente. La validazione del metodo per il nuovo tipo di matrice ha assicurato che i campioni di tessuto paratiroidico crioconservato possano essere efficacemente testati per la funzionalità e la vitalità, garantendo il successo dell'autotrapianto e minimizzando il rischio di ipoparatiroidismo postchirurgico.

Parole chiave: Ghiandole paratiroidi; Trapianto autologo; Iperparatiroidismo; Ipoparatiroidismo

ABSTRACT *Parathyroid hormone (PTH) determination in culture fluid: new application for hyperparathyroidism management. Introduction.* The initial treatment of hyperparathyroidism consists of medical therapies aimed at slowing down the development of the disease and preventing complications. Parathyroidectomy often becomes necessary, which can lead to the development of post-surgical hypoparathyroidism months or years later due to functional failure of the residual parathyroid tissue. A definite therapy seems to be the deferred auto-transplantation of parathyroid tissue fragments taken during parathyroidectomy and cryopreserved for more or less long periods. Cryopreservation ensures long-term preservation of parathyroid tissue fragments, but it is essential to carry out function tests to select those most suitable for auto-transplantation. **Materials and methods.** In this study, the functionality of the parathyroid tissue of 30 patients undergoing parathyroidectomy was assessed, whose fragments were cryopreserved and then thawed for possible auto-transplantation. Six tissue fragments per patient were thawed and these were incubated in 3 different culture media (M1 basal, M1 + 0.6 mM calcium gluconate, M1 + 1.2

mM calcium gluconate). In order to assess functionality based on the amount of PTH released, the culture medium for determination of PTH levels was taken after 24 and 48 hours. Using a home-made modified method, the reproducibility, repeatability and dilution of the method on an unconventional matrix was evaluated. Two samples with low and high PTH concentrations were fractionated into 14 aliquots for testing. Cryopreserved parathyroid tissue samples were tested with LIAISON PTH Assay (Diasorin, Saluggia - VC, Italy). **Results.** The home-made adapted method showed an average CV% of less than 3.2 and 6.2% in intra-series and inter-series tests, respectively. According to dilution tests, all samples showed a trend to underestimate the obtained PTH values as compared to the expected ones. Cryopreserved parathyroid tissue samples were checked for ex vivo functionality and residual viability by measuring the PTH concentration at 24 and 48 hours after thawing, with a mean of 2357.6 ng/L and 2128.3 ng/L, respectively ($p = 0.76$). PTH concentrations increased to 2527.5 ng/L after 24 hours with 0.6 mM calcium and decreased to 1639.2 ng/L with 1.2 mM calcium gluconate. After 48 hours, PTH decreased to 1098.12 ng/L with 0.6 mM and to 932.45 ng/L with 1.2 mM calcium gluconate. **Conclusions:** Our findings showed that only 36.7 % of patients show a correct response to calcium, increasing PTH with 0.6 mmol/L and reducing it with 1.2 mmol/L, while the remaining 63.3 % of patients have lost this capacity. These results underline the importance of an accurate and targeted assessment of tissue function prior to auto-transplantation in order to ensure optimal results in the treatment of post-surgical hypoparathyroidism. This work demonstrated the importance of using an analytically robust, reproducible and reliable diagnostic test that can provide useful information about the tissue to be re-implanted in the patient. Validation of the method for the new type of matrix ensured that cryopreserved parathyroid tissue samples can be effectively tested for function and viability, ensuring successful auto-transplantation and minimising the risk of post-surgical hypoparathyroidism.

Key-words: Parathyroid glands; Autologous transplantation; Hyperparathyroidism; Hypoparathyroidism