

# il Diabete

Vol. 36, N. 1, maggio 2024



## – RASSEGNE

La strana coppia

Linee guida per la gestione del paziente adulto con diabete o con iperglicemia ricoverato in setting clinico non critico

## – EDITORIALI

Il paziente diabetico di tipo 2 con insufficienza renale cronica: le raccomandazioni delle linee guida italiane

## – AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ

Obesità: una malattia recidivante, anche dopo trattamento chirurgico

## – AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Gli SGLT-2 inibitori non vengono prescritti in tutti i casi nei quali sarebbero indicati: dati da uno studio statunitense

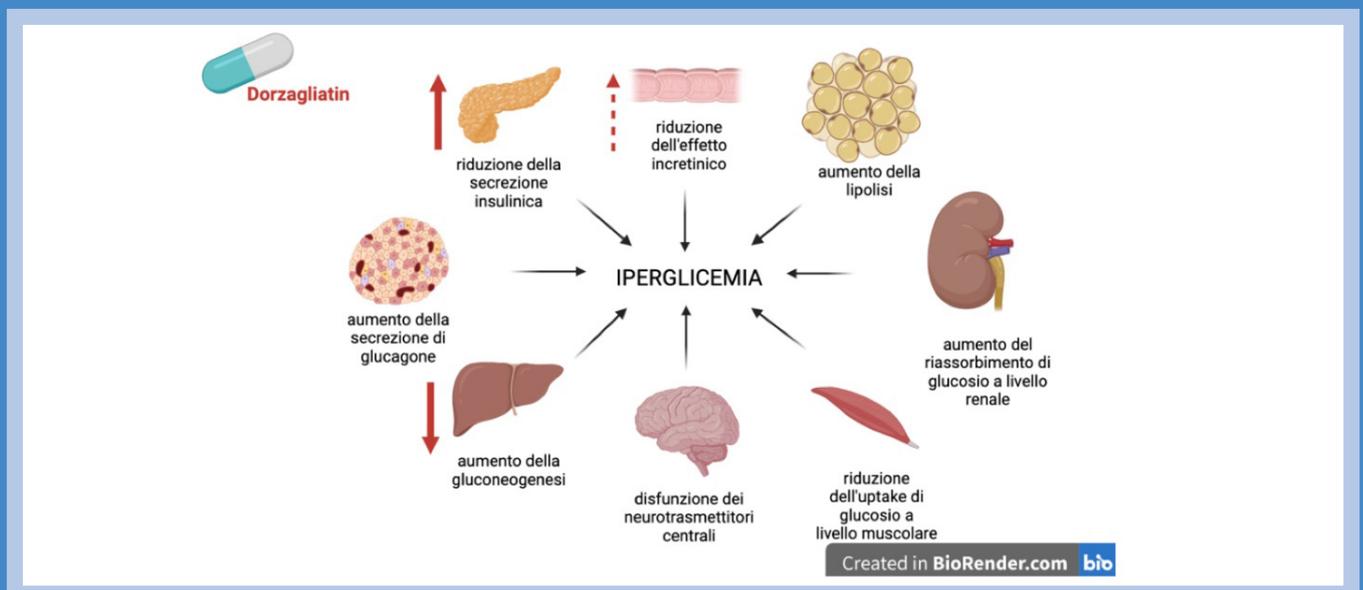
## – JOURNAL CLUB

## – MEDICINA TRASLAZIONALE

Attivatori della glucochinasi: nuovo target per il trattamento del diabete mellito di tipo 2?

## – AGGIORNAMENTO CLINICO

Diabete autoimmune dell'adulto trattato con Semaglutide: un caso clinico con follow-up quinquennale e valutazione periodica della funzionalità beta-cellulare



# il Diabete

Organo ufficiale della  
Società Italiana di Diabetologia

## *Direttore Scientifico*

Sebastiano Squatrito (Catania)

## *Co-direttori*

Luca D'Onofrio (Roma, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Giuseppe Defeudis (Roma)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

## *Comitato di Redazione*

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

## **CONSIGLIO DIRETTIVO SID**

### *Presidente*

Angelo Avogaro (Padova)

### *Presidente Eletto*

Raffaella Buzzetti (Roma)

### *Tesoriere*

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

### *Segretario*

Saula Vigili de Kreutzenberg (Padova)

### *Consiglieri*

Gloria Formoso (Chieti)

Mariangela Ghiani (Cagliari)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Maria Ida Maiorino (Napoli)

Raffaele Napoli (Napoli)

Andrea Natali (Pisa)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Elena Succurro (Catanzaro)

## **UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024**

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

## *Responsabili di Redazione*

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

## Sommario

- **RASSEGNE** A CURA DI LUCIA FRITTITTA E SEBASTIANO SQUATRITO
- 1 **La strana coppia**  
*Michelantonio De Fano, Francesca Porcellati, Carmine Giuseppe Fanelli, Geremia B. Bolli*
- 15 **Linee guida per la gestione del paziente adulto con diabete o con iperglicemia ricoverato in setting clinico non critico**  
*Elena Succurro*
- 25 – **EDITORIALI** A CURA DI SEBASTIANO SQUATRITO  
**Il paziente diabetico di tipo 2 con insufficienza renale cronica: le raccomandazioni delle linee guida italiane**  
*Matteo Monami*
- 30 – **AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ** A CURA DI LUCIA FRITTITTA  
**Obesità: una malattia recidivante, anche dopo trattamento chirurgico**  
*Federica Vinciguerra, Carla Di Stefano, Luigi Piazza, Lucia Frittitta*
- 43 – **AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL  
**Gli SGLT-2 inibitori non vengono prescritti in tutti i casi nei quali sarebbero indicati: dati da uno studio statunitense**
- 45 – **JOURNAL CLUB** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL
- 49 – **MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE**  
A CURA DI CARLA GRECO E LUCA D'ONOFRIO PER IL GRUPPO YoSID  
**Attivatori della glucochinasi: nuovo target per il trattamento del diabete mellito di tipo 2?**  
*Stefano Boni, Eleonora Zanni, Immacolata Conte, Carla Greco*
- 62 – **AGGIORNAMENTO CLINICO** A CURA DI CARLA GRECO E LUCA D'ONOFRIO PER IL GRUPPO YoSID  
**Diabete autoimmune dell'adulto trattato con Semaglutide: un caso clinico con follow-up quinquennale e valutazione periodica della funzionalità beta-cellulare**  
*Martina Antonello, Eleonora Varisco, Sabrina Della Mora, Leonardo Alberto Sechi, Andrea Da Porto*

# il Diabete

---

Vol. 36, N. 1, maggio 2024

**Direzione Scientifica**

Sebastiano Squatrito, Catania

**Direttore Responsabile**

Mattia Righi

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2023 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-445-8

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2401

Nessuna parte può essere duplicata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.

**Fondazione Bologna University Press**

Via Saragozza 10, 40123 Bologna

tel. (+39) 051 232 882; fax (+39) 051 221 019

e-mail: [info@buponline.com](mailto:info@buponline.com)

[www.buponline.com](http://www.buponline.com)

*Periodico riconosciuto "di elevato valore culturale" dal Ministero per i Beni e le Attività Culturali*

Autorizzazione Tribunale di Milano

n. 706 del 2/11/1988

*Avvertenza ai lettori*

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni in merito a dosaggio e impiego di prodotti eventualmente citati negli articoli, e invita il lettore a controllarne personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

# La strana coppia The Odd Couple

Michelantonio De Fano, Francesca Porcellati, Carmine Giuseppe Fanelli,  
Geremia B. Bolli

Sezione di Medicina Interna, Endocrinologia e Malattie del Metabolismo,  
Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2401a>

## ABSTRACT

*Glucagon assays employing specific radioimmunoassay (RIA) techniques are now widely used to characterize pathologic conditions where the effect of the excess or deficiency of glucagon on insulin actions might play a role. Glucagon excess counteracts the action of insulin on glucose metabolism by stimulating glycogenolysis and gluconeogenesis. In diabetes mellitus, hyperglycaemia is the consequence of the glycogenolytic and gluconeogenic effects of glucagon excess occurring in the setting of a relative insulin deficiency (i.e. Type 2 diabetes), whereas excess of glucagon and absent insulin levels are typical features of diabetic ketoacidosis. Although plasma glucagon levels of persons with diabetes are usually increased relative to the prevailing plasma glucose concentrations, it is a paradox that in those patients glucagon levels fail to rise when hypoglycaemia develops. Since glucagon release is considered the primary defence against insulin-induced hypoglycaemia, the defective response of glucagon to hypoglycaemia may favour the development of severe hypoglycaemia. Such defective response to hypoglycaemia in diabetes can be regarded as a condition of selective glucagon deficiency the mechanisms of which remain to be elucidated. It is expected that drugs that are able to reduce glucagon secretion in concert with strategies directed to recover glucagon secretion to hypoglycaemia might contribute to improve the overall glycaemic control in diabetes.*

## KEYWORDS

*Glucagon, glucose counterregulation, diabetes mellitus.*

## BREVE EXCURSUS STORICO

Due anni fa ricorreva il centesimo anno dal primo utilizzo dell'insulina per il trattamento del diabete mellito. Nel corso del tempo, numerose sono state le ricerche che hanno permesso di ricostruire più dettagliatamente le tappe di questo straordinario capitolo della storia della Medicina, svelando importanti retroscena.

È bene riconoscere che, anche quando si parla di glucagone, è necessario partire dall'istituto di Fisiologia dell'Università di Toronto: infatti, nel 1921, Banting e Best osservarono, dopo la somministrazione del "loro" estratto pancreatico nei cani pancreatectomizzati, un rapido incremento della glicemia che precedeva l'effetto ipoglicemizzante (1). Inizialmente, tale fenomeno fu ritenuto secondario alla secrezione di adrenalina, ma già un anno dopo, Murlin e i suoi collaboratori, attribuirono tale evento ad un contaminante presente nell'estratto pancreatico di Banting e Best, a cui diedero il nome di "glucagone" (2).

Venticinque anni più tardi, Sutherland e de Duve identificarono le alfa-cellule pancreatiche come sede di sintesi del glucagone (3), e nel 1953 Bromer e i suoi collaboratori riuscirono a descrivere la struttura amminoacidica del glucagone suino (4). Solo due anni dopo, il gruppo di Staub fu in grado di estrarre, purificare e cristallizzare il glucagone (5), in modo da introdurne l'utilizzo per il trattamento dell'ipoglicemia secondaria a terapia con insuli-

na o sulfoniluree nelle persone con diabete, ma anche in chi, affetto da schizofrenia, o depressione psichica, veniva sottoposto a trattamento con la “insulin shock therapy”, introdotta nella pratica clinica, dallo psichiatra austriaco Manfred Sakel a Vienna all’inizio degli anni Trenta (Fig. 1) (6).

Poco tempo dopo, nel 1959, Roger Unger e i suoi collaboratori della University of Texas Southwestern Medical Center a Dallas, furono i primi a misurare i livelli di glucagone nell’animale e nell’uomo, utilizzando la tecnica del RIA (Radio Immuno Assay) con l’anticorpo 30 K (7), spianando la strada all’importante filone di ricer-

ca riguardante fisiologia e fisiopatologia del glucagone, innegabilmente legato a quella dell’insulina. Fu Fausto Santeusano dell’Università di Perugia, uno dei primi ricercatori ad accorrere a Dallas per studiare il glucagone già alla fine degli anni Sessanta, ad importare in Italia l’antisiero 30 K per la determinazione del glucagone nell’uomo. A tal proposito, in una recente rassegna (8), Robertson ha denominato la coppia insulina-glucagone “The Odd Couple”, traendo spunto da uno spettacolo di Broadway, scritto da Neil Simon nel 1965, che vedeva come protagonisti due uomini che condividevano lo stesso appartamento, ma dormivano in due camere da letto

**Figura 1** ♦ Un paziente affetto da schizofrenia, in coma ipoglicemico conseguente alla Insulin Shock Therapy. All’inizio degli anni Trenta lo psichiatra austriaco Manfred Joshua Sakel (1900-1957) trattava la schizofrenia ed alcune forme di depressione psichica con la Insulin Shock Therapy. Sakel aveva inizialmente utilizzato questo metodo per curare i morfinomani nella sua clinica a Berlino. Il metodo proposto da Sakel per il trattamento della schizofrenia, era in contrapposizione, negli stessi anni, con quello proposto dall’ungherese Ladislas Joseph von Meduna (1896-1964), che provocava convulsioni anziché coma. Von Meduna era convinto che ci fosse un antagonismo biologico tra epilessia e schizofrenia, per cui riteneva che inducendo convulsioni fosse possibile curare la schizofrenia. Le convulsioni venivano provocate iniettando canfora, e in seguito pentametilentetrazolo



**Figura 2** ♦ Immagine tratta dalla rappresentazione teatrale della “Strana coppia”, opera di Neil Simon, scritta nel 1965. La commedia venne rappresentata per la prima volta al Plymouth Theatre a Broadway il 3 ottobre 1965, per la regia di Mike Nichols: i protagonisti erano Art Carney e Walter Matthau



diverse ed erano l'uno l'opposto dell'altro per tantissimi aspetti (Fig. 2). Così anche per il glucagone e l'insulina, sintetizzati in differenti cellule, eppure nella stessa sede (l'isola pancreatica).

## FISIOLOGIA E FUNZIONI METABOLICHE DEL GLUCAGONE

Il glucagone è un ormone costituito da 29 amminoacidi e dal peso molecolare di 3485 dalton, secreto dalle alfa-cellule pancreatiche. Il suo precursore è il proglucagone che, tuttavia, non presenta il solo glucagone come prodotto terminale del suo metabolismo; infatti, a livello delle cellule L dell'ileo, dal proglucagone derivano peptidi come l'oxintomodulina, la glicentina e i più celebri Glucagon Like Peptides (GLP-1 e GLP-2) (9).

L'esistenza di una quota di glucagone di origine extra-pancreatica era già stata ipotizzata nel 1948 da Sutherland e de Duve, e definitivamente confermata da studi più recenti effettuati su soggetti pancreatectomizzati (10). In questo modello, infatti, le stesse cellule L dell'ileo sono in grado di secernere glucagone in seguito al glucosio ingerito durante un carico orale (OGTT). Al momento, tuttavia, non è noto l'effettivo impatto di tale quota di glucagone sul metabolismo glucidico. Ammesso che il

glucagone extra-pancreatico abbia degli effetti metabolici, questi debbono essere veramente modesti data la possibilità molto bassa di chetoacidosi e l'assente risposta controregolatoria all'ipoglicemia insulinica nelle persone con pancreatectomia totale (11).

I livelli di glicemia costituiscono lo stimolo più potente per la secrezione del glucagone: come è ben noto, infatti, l'ipoglicemia incrementa la secrezione di glucagone mentre l'iperglicemia esplica l'effetto opposto. L'effetto dell'ipoglicemia sulle alfa-cellule è mediato da una consensuale riduzione dei livelli di glucosio a livello intrainsulare, da una riduzione della secrezione insulinica da parte delle beta-cellule con de-inibizione della secrezione di glucagone, e infine dall'attivazione del sistema simpatico (con aumento della secrezione catecolaminergica) e parasimpatico (con rilascio di acetilcolina) (9).

Tornando alla nostra “Odd Couple”, la secrezione del glucagone è finemente regolata a livello intrainsulare dall'azione dell'insulina (12), grazie a meccanismi non ancora completamente definiti. Si ritiene, infatti, che un ruolo importante possa essere svolto dalla direzione del flusso ematico insulare, diretto prevalentemente dal centro alla periferia e quindi dalle beta-cellule verso le alfa-cellule (8). Il sangue refluo dalle zone centrali dell'insula, costituite da beta-cellule, esporrebbe quindi le alfa-cellule, situate in periferia, ad elevate concentrazioni di insulina, in tal modo prospettando come il ruolo regolatorio dell'insulina sulla soppressione della risposta di glucagone si concretizzi attraverso la circolazione stessa. Tale ipotesi è stata recentemente confutata, sostenendo, al contrario un effetto paracrino dell'insulina per sé, indipendente dalla circolazione ematica (8). Come già accennato, è stato inoltre dimostrato in vivo, come alti livelli di glucosio ematico inibiscano la secrezione di glucagone. Pertanto, l'effetto ipoglicemizzante dell'insulina può essere “permissivo” o addirittura additivo agli effetti diretti del glucosio (iperglicemia) nel sopprimere la funzione delle alfa-cellule, rendendo complesso distinguere il singolo contributo dei due meccanismi nel ridurre i livelli di glucagone (13-14).

In condizioni di ipoglicemia, in vivo, l'effetto inibitorio che esercita l'insulina sulle alfa-cellule ovviamente si riduce, in quanto è ridotta, a sua volta, la secrezione insulinica da parte delle beta-cellule. Tuttavia, è stato dimostrato come, in vitro, le alfa-cellule non siano in grado di rilasciare glucagone quando sono esposte a concentrazio-

ni di glucosio molto basse, e ciò è stato variamente attribuito alla mancata innervazione o ad un ipotetico danno cellulare subito durante le procedure di isolamento (8). Ispirandosi ai risultati di numerosi studi, Robertson e i suoi collaboratori hanno avanzato il meccanismo definito come “insulin switch-off” (15-16): effettuando studi di perfusione, su preparati di pancreas isolato e perfuso, è stato di fatto evidenziato come i preparati insulari esposti inizialmente ad elevate concentrazioni di glucosio, successivamente interrotte, così da stimolare la secrezione insulinica per poi “spegnerla”, siano in grado di secernere glucagone. Pertanto, per indurre la secrezione di glucagone in vitro, sembrano essere fondamentali sia la presenza di questo “switch off” del segnale insulinico che bassi livelli di glucosio.

Altri fattori in grado di stimolare la secrezione del glucagone sono l'esposizione ad amminoacidi (come alanina, arginina e leucina) e peptidi gastrointestinali (gastrina, CCK), o condizioni come esercizio fisico, stress e digiuno. Inoltre, elevati livelli di glucagone sono stati riscontrati associarsi a condizioni di ipercortisolemia ed eccesso di ormone della crescita. Al contrario, ormoni come la somatostatina e il GLP-1, ma anche gli acidi grassi liberi e i corpi chetonici inibiscono la secrezione di glucagone (9).

Il glucagone esercita un ruolo fondamentale nella regolazione dei più importanti processi metabolici. La sua attività principale è esplicata a livello epatico, dove stimola la glicogenolisi, la gluconeogenesi e la chetogenesi (azioni totalmente opposte a quelle dell'insulina) (9). Solo in condizioni di iperglucagonemia sovralfisiologica e prolungata è stato dimostrato un effetto diretto sull'utilizzazione del glucosio (17). Altra azione rilevante è quella di stimolo della neoglucogenesi ed in particolare della conversione degli aminoacidi in glucosio, sempre in contrapposizione a quanto fisiologicamente regolato dall'insulina, come del resto la riduzione dell'appetito associata ad una maggiore spesa energetica.

Per quanto riguarda il metabolismo lipidico, il glucagone stimola lipolisi e chetogenesi, anche se è necessario fare una distinzione tra soggetti sani e soggetti con diabete mellito di tipo 1 (DMT1). Infatti, il gruppo di Liljenquist ha osservato come il glucagone stimoli il rilascio di C-peptide a fronte di una riduzione della concentrazione arteriosa del glicerolo e dei corpi chetonici, nei soggetti sani; esattamente il contrario è stato invece evidenziato

nelle persone con DMT1. Pertanto, Liljenquist e i suoi collaboratori concludevano come, nei soggetti sani, il glucagone, mole per mole, sia in grado di esercitare una maggiore attività nello stimolare il rilascio epatico di quanto ne abbia l'insulina nell'opporci a questo processo e che, al contrario, sempre considerando mole per mole, l'insulina presenti un'attività antilipolitica maggiore rispetto all'attività lipolitica del glucagone (18).

Infine, ma non in ordine di importanza, il glucagone riveste il ruolo di principale ormone controregolatorio nella prevenzione e correzione dell'ipoglicemia (9).

### **EFFETTI DEL DEFICIT DI GLUCAGONE IN RISPOSTA ALL'IPOGLICEMIA**

Nei soggetti sani, la soppressione selettiva della secrezione di glucagone con somatostatina o con iperinsulinemia elevata, durante un'ipoglicemia insulinica prolungata, attenua la risposta contro-regolatoria di incremento della produzione endogena di glucosio (9). Tale osservazione suggerisce il ruolo del glucagone nella controregolazione glucidica: infatti un'ipoglicemia severa può verificarsi in seguito al deficit isolato di secrezione del glucagone e nonostante un aumento compensatorio nella secrezione di adrenalina (19). Non è quindi necessario un deficit combinato dei due ormoni per provocare un'ipoglicemia insulinica grave.

È importante sottolineare come tale osservazione sia stata effettuata anche nel DMT1, utilizzando lo stesso modello d'induzione dell'ipoglicemia che ben riproduce il contesto clinico vissuto dalle persone affette da questa condizione. Infatti, la secrezione di glucagone risulta compromessa già precocemente nel DMT1 (20), esponendo pertanto i pazienti, all'inizio poco esperti nel gestire la terapia insulinica multi iniettiva, ad un rischio elevato di ipoglicemia severa (21). Peraltro il deficit di risposta al glucagone, non sembra mostrare alcun miglioramento in seguito ad una prevenzione meticolosa dell'ipoglicemia che, al contrario, esita nel recupero, seppure parziale, delle risposte adrenergiche (22).

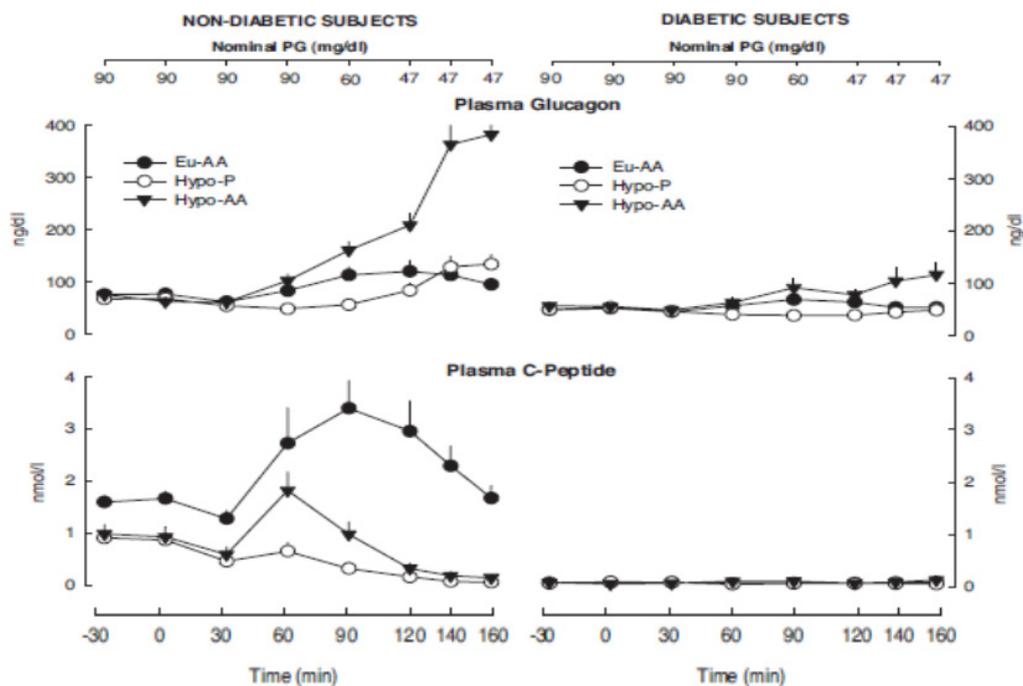
A distanza di 50 anni dalla sua scoperta (23), i meccanismi alla base della difettosa risposta di glucagone all'ipoglicemia nel DMT1 rimangono un mistero. È un difetto che segue la comparsa del diabete, progressivo e non reversibile e pertanto più accentuato e presente dopo anni di diabete (24), non legato a neuropatia autonoma. Il

glucagone c'è, è sintetizzato dalla cellula alfa, viene secreto in risposta all'ipoinulinemia e allo stimolo con aminoacidi, ma non quando la cellula alfa viene esposta allo stimolo normalmente più potente alla sua secrezione, l'ipoglicemia. L'ipotesi più accreditata è che la cellula alfa, che comunque continua a sintetizzare e produrre glucagone nel DMT1, non risponde all'ipoglicemia per la perdita di "segnali" intra-insulari, per il danno anatomico e funzionale dell'insulite che danneggia il fisiologico cross-talking cellula alfa e beta. La perdita delle cellule beta e l'assenza della riduzione dell'insulinemia "intra-islet" potrebbe essere uno dei segnali persi nel DMT1. Alcuni lavori in effetti hanno mostrato correlazione fra secrezione pancreatica residua di insulina e risposta del glucagone all'ipoglicemia nel DMT1 (20-21).

È interessante come il deficit di risposta del glucagone sembri essere specifico per il glucosio; infatti la risposta a stimoli non-glucidici come l'aminoacido arginina, viene mantenuta (23). Quest'ultima osservazione ed il fatto che numerosi aminoacidi siano in grado di stimolare il rilascio di glucagone da parte della alfa-cellula pancrea-

tica (25), ha incoraggiato numerosi studi per verificare l'ipotesi che una miscela di aminoacidi somministrata per via endovenosa (26-27), o la somministrazione di alanina endovenosa e orale (28-29), potessero incrementare la risposta del glucagone per contrastare l'ipoglicemia o migliorare il recupero dalla ipoglicemia stessa nelle persone con DMT1. In questo contesto è stato successivamente acclarato come la componente proteica di un pasto misto sia in grado di esercitare il potenziamento della risposta della alfa-cellula pancreatica (30-31). Infatti, dopo somministrazione per via orale di una miscela di aminoacidi in grado di riprodurre le concentrazioni plasmatiche che si ottengono dopo l'ingestione di un pasto misto (30), la risposta del glucagone plasmatico all'ipoglicemia risultava potenziata nei soggetti non diabetici e "normalizzata" nella persone con DMT1; ad esempio, pazienti che prima non rispondevano con l'aumento del glucagone durante ipoglicemia, dopo l'ingestione degli aminoacidi mostravano una risposta di glucagone che risultava nel range osservato nei soggetti non diabetici per lo stesso livello di ipoglicemia (Fig. 3) (31).

**Figura 3** ♦ La somministrazione orale di una miscela di aminoacidi potenzia la risposta del glucagone plasmatico all'ipoglicemia nei soggetti senza diabete (Hypo-AA) e la "normalizza" nella persone con DMT1; si nota infatti come pazienti che non rispondevano al placebo (Hypo-P) con l'aumento del glucagone durante ipoglicemia, dopo l'ingestione degli aminoacidi (Hypo-AA) mostrano una risposta di glucagone che risultava nel range osservato nei soggetti senza diabete per lo stesso livello di ipoglicemia (Hypo-P). Mod. da (31)



A questo si associava una riduzione della velocità di infusione del glucosio (Glucose Infusion Rate: GIR) negli studi di clamp di ipoglicemia in cui venivano somministrati aminoacidi rispetto a quelli di ipoglicemia con placebo, suggerendo un effetto protettivo degli aminoacidi nei confronti dell'ipoglicemia (31). L'endpoint secondario di questi studi era quello di indagare quale fosse il ruolo degli aminoacidi orali sulle funzioni cognitive. I risultati ottenuti da tutti i test approntati, hanno dimostrato un generale miglioramento delle prestazioni durante ipoglicemia dopo ingestione di aminoacidi rispetto alla somministrazione di placebo. In particolare, tra le varie aree cognitive esplorate, la capacità di memoria a breve termine, quella di mantenere l'attenzione, di elaborare informazioni e l'efficienza psicomotoria venivano influenzate positivamente dall'incremento degli aminoacidi (31).

I risultati degli studi descritti (28, 30-31), rappresentano la prima dimostrazione del fatto che sembra possibile ripristinare in qualche modo la funzione della alfa-cellula, ed ulteriori risultati sono attesi nel prossimo futuro, anche da studi sviluppati in scenari sperimentali più vicini alle condizioni di vita reale delle persone con DMT1. A tal proposito è tuttavia necessario sottolineare la difficoltà di chi fa ricerca clinica nel nostro Paese, nel campo della fisiopatologia dell'ipoglicemia, alla luce della posizione di molti Comitati Etici Regionali, che non hanno più garantito l'autorizzazione agli studi. Decisione peraltro molto discutibile considerando: a) la sicurezza degli studi, b) l'importanza fisiopatologica e clinica del tema, 3) la diversa posizione dei CER di altri Paesi (UK, EU, USA).

L'ipoglicemia severa è un evento acuto, potenzialmente letale, caratterizzato da un'alterazione dello stato cognitivo tale da rendere necessaria l'assistenza di una terza persona per il ripristino dell'euglicemia. Può occorrere indipendentemente dai valori glicemici e richiede un intervento immediato. È fondamentale, quindi, che sia la persona con diabete che i caregivers siano ben informati sulle potenziali conseguenze degli episodi e sulle modalità necessarie al rapido ripristino dell'euglicemia (32).

Numerosi studi epidemiologici stimano che gli episodi di ipoglicemia severa nelle persone con DMT1 variano da 70 a 159 eventi/100 persone/anno (33). La presenza di "hypoglycemia unawareness" costituisce uno dei

principali fattori predisponenti all'ipoglicemia severa, con una prevalenza compresa tra il 17 e il 36% nel DMT1 (34-36).

Nel 1941 fu il dr. Robert D. Lawrence, un chirurgo otorinolaringoiatra scozzese affetto da diabete mellito dal 1919, a notare che nel corso della malattia, la sintomatologia dell'ipoglicemia, che chiamava reazione insulinica, tende a cambiare nel tempo: "[...] le reazioni insuliniche possono differire molto da quelle iniziali al punto che i pazienti sono pericolosamente inconsapevoli del loro esordio [...]. Lo stesso paziente può in un momento sperimentare i sintomi premonitori iniziali e, in un altro, essere del tutto inconsapevole di un attacco imminente [...] potremmo dire che i tessuti si adattano a livelli più bassi di glicemia [...]" (37). Molti anni più tardi, Cryer ha proposto il concetto di "Hypoglycemia Associated Autonomic Failure (HAAF)" nelle persone con diabete, basandosi sul concetto che il reiterare di episodi ipoglicemici costituisce la causa principale sia di una ridotta risposta controregolatoria all'ipoglicemia che dell'incapacità di riconoscerne i sintomi (38). Tale condizione, ora nota come "Sindrome di Cryer" (39), è ampiamente considerata come un disordine funzionale ben distinto dalla classica neuropatia autonoma presente nelle persone con diabete (40).

Per quanto riguarda, invece, il diabete mellito di tipo 2 (DMT2), sia il numero di episodi di ipoglicemia severa che la prevalenza di hypoglycemia unawareness risultano inferiori (per esempio, quest'ultima riguarda solo il 6-8% delle persone affette da DMT2) (41-42) e sono correlate alla durata di malattia e alla tipologia di farmaci ipoglicemizzanti presenti in terapia (es. sulfoniluree e insulina, specialmente per gli schemi multi iniettivi).

Come detto in precedenza, già poco tempo dopo la sua scoperta, il glucagone ha rappresentato un prezioso strumento terapeutico per trattare l'ipoglicemia e tuttora viene raccomandato dalle principali società scientifiche che suggeriscono la prescrizione di glucagone a tutti i soggetti a rischio di incorrere in episodi di ipoglicemia di livello 2 e sviluppare ipoglicemie severe, sia adulti che in età pediatrica, indipendentemente dal compenso glicemico e dalla durata di malattia (32).

Tuttavia, nonostante le raccomandazioni societarie, il reale utilizzo del glucagone nella pratica clinica e la consapevolezza della necessità della sua prescrizione da parte dei medici, risulta veramente limitato (43).

Tale dato può essere parzialmente giustificato considerando le difficoltà di preparazione e somministrazione delle formulazioni iniettive (GlucaGen Hypokit e Glucagon Emergency Kit), le uniche presenti fino a qualche tempo fa. Entrambe sono somministrabili per via sottocutanea o intramuscolare (44) e richiedono la ricostituzione del farmaco prima dell'utilizzo mediante il cosiddetto protocollo "four steps" (45). Alcuni studi di simulazione hanno permesso di evidenziare molteplici criticità che si associano all'utilizzo del glucagone iniettivo: per esempio, tempi molto lunghi necessari per la preparazione, scarsa conoscenza e formazione dei caregivers e gravi errori nella somministrazione (in alcuni casi, il panico e la confusione ha portato i caregivers a somministrare insulina piuttosto che glucagone) (46).

È stato quindi necessario effettuare un passo in avanti, in modo da rendere più semplice e sicuro il ricorso al glucagone in condizioni di ipoglicemia severa. Per tutte queste motivazioni, è stata sviluppata e commercializzata la formulazione nasale, contenuta in un device monouso e già pronto all'uso (Amphastar Pharmaceuticals, Inc). Mediante questo approccio, il glucagone è assorbito in maniera rapida e passiva (pertanto senza necessità di inalazione attiva), attraverso la mucosa nasale anteriore (47). Tale formulazione è approvata per il trattamento dell'ipoglicemia severa nelle persone con diabete di età superiore a 4 anni.

La possibilità di somministrare il glucagone per via nasale è stata ipotizzata per la prima volta nel 1982 da Antonio Pontiroli (48-49) ma, per molteplici ragioni, ci sono voluti diversi anni affinché diventasse realtà. Nell'ultima decade, diversi studi di farmacocinetica e farmacodinamica (50), studi preclinici su animali e successivi studi su popolazioni adulte e pediatriche, affette da DMT1 e DMT2 (51-52), hanno evidenziato profili di efficacia, sicurezza e tollerabilità del glucagone nasale sovrapponibili a quelli della formulazione iniettiva. Inoltre studi randomizzati e controllati, unitamente ad evidenze della real life, hanno confermato come la sua somministrazione venga facilmente e rapidamente garantita anche in assenza di adeguata istruzione del caregiver, viceversa indispensabile e peraltro non sempre garanzia di successo per la somministrazione iniettiva.

L'utilità della somministrazione di glucagone è particolarmente evidente laddove la persona in ipoglicemia insulinica abbia un'avanzata compromissione della fun-

zione cognitiva che impedisce l'assunzione di glucosio orale sia spontanea che assistita per il rischio di mancata deglutizione e conseguente ab ingestis. In questo caso il caregiver dovrebbe somministrare glucagone (meglio se per via nasale che iniettabile) che a distanza di 7-10 minuti innalza la glicemia per l'effetto glicogenolitico, con conseguente miglioramento della neuroglicopenia e dello stato di coscienza fino a consentire l'ingestione orale di glucosio. Si può anche ripetere una seconda dose di glucagone, ma il suo effetto glicogenolitico è ridotto rispetto a quello della prima dose per il noto effetto della tachifilassi in corso di somministrazioni ripetute di glucagone. È allora prudente subito dopo la prima dose di glucagone, pensare a chiamare il servizio 118, laddove il soggetto non riprenda entro 15 minuti.

Un'alternativa, da pochi anni disponibile in alcuni Paesi, è la formulazione liquida di glucagone, contenuta in una siringa o penna pronta all'uso, con ago non visibile e senza necessità di essere ricostituita (Gvoke). Essa è disponibile alla dose di 0,5 mg o 1 mg, rispettivamente per l'utilizzo pediatrico e per adulti. Anche per questa formulazione, il profilo di sicurezza è risultato sovrapponibile a quello del glucagone iniettivo mentre due studi randomizzati controllati con disegno cross over, su popolazione affetta da DMT1 hanno evidenziato come il device utilizzato per la formulazione liquida sia più vantaggioso se confrontato con i kit convenzionali di somministrazione (53-54).

Un'ulteriore formulazione, già approvata dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 2021, è il Dasiglucagon, analogo iniettivo del glucagone con modifiche della struttura amminoacidica in modo da garantire una maggiore stabilità, e contenuto in un device monouso già pronto all'uso. Studi controllati randomizzati e dati di real world hanno evidenziato un'efficacia e un profilo di sicurezza sovrapponibili alla formulazione convenzionale, ma con una modalità di somministrazione nettamente più semplice (55).

Sono in fase di studio altre formulazioni in cui la stabilità e il successivo utilizzo clinico degli analoghi del glucagone dovrebbe essere garantita attraverso utilizzo di solventi polari (es.: DiMethyl Sulfoxide) (54), biochaperoni o formulazioni liofilizzate (56-57).

Infine, è doveroso accennare all'affascinante sfida rappresentata dallo sviluppo del microinfusore biormonale, un sistema che permette la somministrazione sia di

insulina che di glucagone. Studi che hanno confrontato tale tecnologia con il convenzionale microinfusore insulinico hanno evidenziato una riduzione sia degli episodi di ipoglicemia che di iperglicemia (58-59). Uno di questi sistemi, Inreda, è già disponibile nei Paesi Bassi, ma permangono difficoltà relate all'instabilità della formulazione liquida del glucagone, con necessità quindi di sostituzione giornaliera e di due sistemi di pompe differenti (58). La maggiore stabilità del Dasiglucagon potrebbe costituire un'arma preziosa, e in tale direzione sembrano andare i dati preliminari, particolarmente promettenti, del sistema iLet (60).

### EFFETTI DELL'ECCESSO DI GLUCAGONE

Il contributo del glucagone all'iperglicemia post prandiale è stato dimostrato nei soggetti sani e nei soggetti con diabete, sia DMT1 che DMT2 (61-63). Nei soggetti senza diabete, però, gli aumenti nella concentrazione del glucagone, che possono essere di entità variabile, sembrano avere un ruolo molto più limitato a causa del consensuale rapido aumento dei livelli di insulina, che smorza l'effetto stimolatorio del glucagone sulla produzione endogena di glucosio (61).

Tralasciando le elevate concentrazioni associate a rare condizioni patologiche (come i glucagonomi), un eccesso di glucagone (anche solo relativo) può comunemente riscontrarsi nel diabete, in maniera inversamente correlata alla quantità di insulina secreta e alla sua azione. Infatti, studi che hanno utilizzato la somatostatina per via endovenosa, al fine di sopprimere il glucagone endogeno durante la reinfusione di glucagone e garantirne concentrazioni costanti nel sistema portale, hanno evidenziato quanto l'effetto del glucagone sul metabolismo glucidico dipenda dalle concentrazioni prevalenti di insulina (63). Quindi l'ipeglucagonemia del diabete, sia di tipo 1 che di tipo 2, è sempre relativa ad una più o meno ridotta secrezione di insulina.

Nei casi più gravi, e cioè quando sono presenti elevati livelli di glucagone con bassi o, addirittura, assenti livelli di insulina, vi è un alto rischio di chetoacidosi diabetica: infatti, in tali circostanze, l'iperglicemia risultante non è in grado di sopprimere la secrezione di glucagone.

È importante specificare che una condizione di iperglucagonemia relativa si associa all'aumento della produ-

zione endogena di glucosio, che risulta essere alla base dell'iperglicemia a digiuno spesso presente nelle persone affette da DMT2, soprattutto se affette da sovrappeso o, peggio ancora, da obesità.

Partendo da queste basi fisiopatologiche, mentre nel DMT1 la ricerca farmacologica si è orientata verso la progettazione e commercializzazione di analoghi dell'insulina, in grado di riprodurre più da vicino le dinamiche insulinemiche della fisiologia, nel DMT2 l'interesse della ricerca farmacologica si è rivolto più da vicino alla possibilità di attenuare, smorzare la secrezione di glucagone, con l'obiettivo di favorire il controllo dell'iperglicemia sia a digiuno che nel post prandiale.

A partire dal GLP-1 endogeno, che deriva dallo stesso precursore del glucagone, e successivamente dal peptide exendine-4, è nata la straordinaria opportunità terapeutica della classe dei GLP-1 RAs, che ha modificato radicalmente l'approccio terapeutico al DMT2, considerando gli ormai ben noti effetti sul controllo glicemico, sul calo ponderale e i benefici sul danno d'organo (64).

La ricerca nel campo del sistema incretinico non si è fermata ai "soli" GLP-1 RAs. Infatti, com'è ben noto, in alcuni Paesi è già disponibile nella pratica clinica il primo agonista che agisce sia sul recettore del GLP-1 che su quello del Glucose-dependent Insulinotropic Peptide (GIP), altro ormone incretinico prodotto a livello intestinale, e all'orizzonte vi sono i cosiddetti tripli agonisti che prevedono un'azione agonista anche sul recettore del glucagone.

Il profilo di azione del GIP non è sovrapponibile a quello del GLP-1, soprattutto nei confronti del glucagone (65). Per esempio, il GIP ha un effetto stimolatorio sulla secrezione del glucagone: infatti, quando si valuta l'effetto incretinico (vale a dire l'incremento dell'insulinemia secondario all'ingestione orale di una certa quantità di glucosio rispetto a quella rilevata dopo somministrazione della stessa quantità ma per via endovenosa) si nota una maggiore soppressione del glucagone quando il glucosio viene somministrato per via endovenosa e ciò potrebbe essere spiegato proprio dall'effetto stimolatorio del GIP (e del GLP-2) sul glucagone in risposta all'ingestione di glucosio. Questo è stato verificato sia nei soggetti sani (66) che in soggetti con DMT2 nei quali, inoltre, è stato dimostrato come il GIP possa stimolare la secrezione di glucagone a digiuno, in ipoglicemia ma anche in iperglicemia durante studi di clamp (67-68).

Una questione ancora aperta è comprendere come il doppio agonista possa influenzare la secrezione di glucagone, considerando gli effetti agli antipodi dei singoli componenti. Uno studio effettuato su persone con DMT2, in cui sono stati infusi GLP-1 e GIP singolarmente e successivamente insieme, conferma un'antagonizzazione del GIP sull'effetto soppressorio sul glucagone esercitato dal GLP-1 (69). Tuttavia, tirzepatide, l'unico doppio agonista al momento disponibile, ha mostrato di essere in grado di sopprimere maggiormente la secrezione di glucagone rispetto a dulaglutide, a digiuno (70) e anche aggiustando il dato per le concentrazioni di glucosio (71).

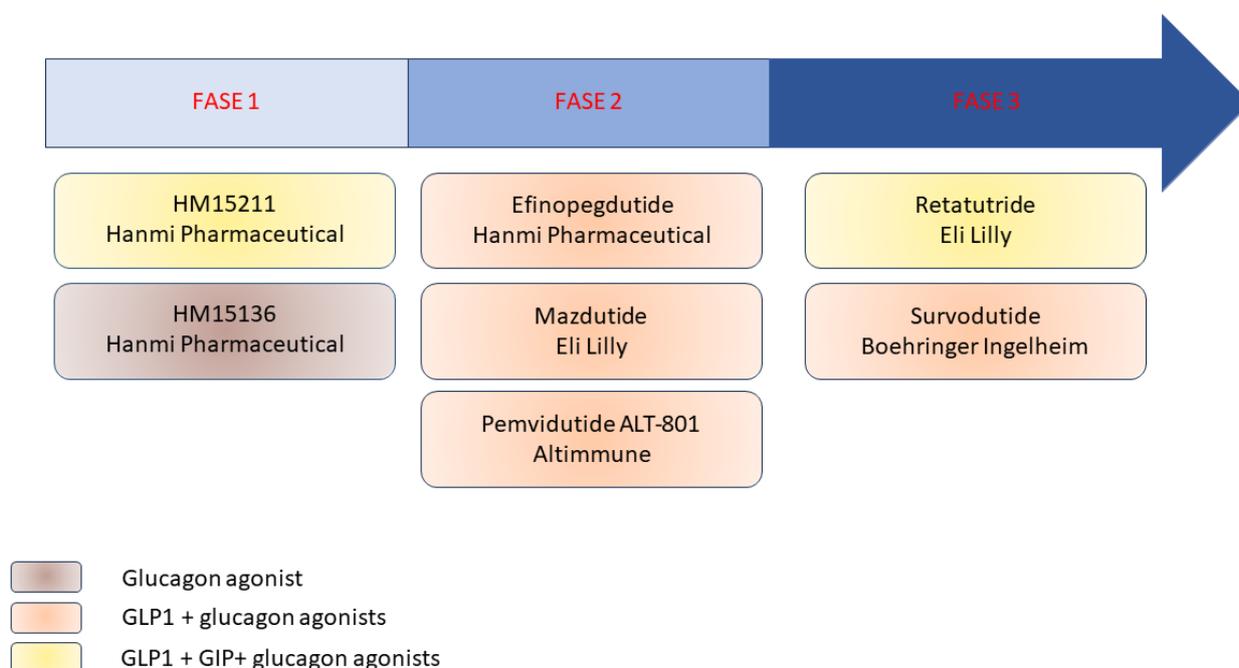
L'azione del GIP sulla secrezione del glucagone, comunque, non sembra impattare sull'efficacia di tirzepatide, considerando i dati entusiasmanti provenienti dagli studi preclinici e clinici; sembra, infatti, che a prendere il sopravvento sia l'effetto "incretinico" dell'agonista del GIP, quasi completamente perso nella fisiopatologia del DMT2 (fenomeno noto come "resistenza al GIP") e "restaurato" con la terapia farmacologica, insieme, ovviamente, a quello del GLP-1 RA (65). Tuttavia, restano tantissimi aspetti di fisiopatologia ancora da chiarire, che diventano ancora più numerosi se ci si sposta sui tripli agonisti. Infatti, mentre per tanti anni l'antagonismo del recettore del glucagone (CcgR) è stato considerato un probabile

target terapeutico per il DMT2, gli effetti avversi delle molecole studiate (tra cui l'incremento del colesterolo LDL, del peso corporeo, del grasso epatico e della pressione arteriosa) ha, di recente, orientato l'interesse terapeutico verso un solo a prima vista paradossale, agonismo per il CcgR (72).

In effetti, l'agonismo nei confronti del CcgR ha dimostrato di possedere un importante potenziale antiobesogenico e antidiabetico in quanto studi effettuati, sia sull'animale che sull'uomo, hanno evidenziato una forte riduzione dell'intake di cibo e un significativo incremento del dispendio energetico sistemico (73-74). Per quanto riguarda il primo aspetto, nonostante i meccanismi non siano stati del tutto chiariti, sembra essere correlato ad afferenze epatiche vagali che esprimono CcgR e che convogliano gli stimoli all'ipotalamo, oltre che ad un'azione diretta su CcgR espresso a livello del nucleo arcuato (75-76). L'incremento del dispendio energetico è stato dimostrato sia in acuto che in cronico e, per quest'ultimo caso, sembra originare principalmente da un ipertono simpatico che stimola lo shift da tessuto adiposo bianco a bruno e intensifica la termogenesi (77).

Nonostante un'iperglicemia transitoria, i benefici dell'agonismo di CcgR si notano anche sulla secrezione insulinica, sia attraverso meccanismi glucosio-dipendenti

**Figura 4** ♦ Pipeline di farmaci di "next generation" per il trattamento dell'obesità. Mod. da (83)



che indipendenti (78), che sulla sensibilità insulinica periferica, indipendentemente dalla secrezione stessa dell'insulina e da effetti GLP-1 mediati. Inoltre, l'agonismo di GgcR sembra avere importanti vantaggi riguardo l'accumulo di grasso epatico, il miglioramento del metabolismo lipidico sistemico e del metabolismo degli aminoacidi (79-80).

Per quanto detto, i primi dati provenienti dagli studi clinici con i tripli agonisti (come, per esempio, retatutride) risultano particolarmente promettenti sia per quanto riguarda il controllo glicemico (paragonabile a quello di tirzepatide), ma soprattutto, per la riduzione del peso corporeo (81-82). Infatti, questa classe di farmaci sembra combinare tra loro l'efficacia sulla glicemia dei doppi agonisti GLP-1/GIP e lo straordinario impatto sul calo ponderale dei doppi agonisti GLP-1/glucagone (che sembrano invece avere un'efficacia meno rilevante sul controllo glicemico), affacciandosi all'orizzonte come ulteriore passo in avanti per il trattamento del DMT2 e dell'obesità (83).

## CONCLUSIONI

A poco più di un secolo dalla sua scoperta, soltanto negli ultimi anni si sta riconoscendo la giusta considerazione, in termini fisiopatologici, al secondo componente della "Odd Couple". Considerato per troppo tempo solo come un farmaco per trattare l'ipoglicemia, il glucagone, con le sue numerose implicazioni metaboliche, sta aprendo la strada a nuove ed interessanti frontiere per il trattamento del DMT2, dell'obesità e probabilmente non solo (promettenti anche i dati che provengono dagli studi sulla steatosi epatica e nella prevenzione del declino cognitivo).

È importante, comunque, sottolineare come vi sia stata una decisiva evoluzione anche nell'approccio al trattamento dell'ipoglicemia severa, con le formulazioni recentemente approvate e con le altre auspicabilmente in arrivo.

Dopo quanto detto, considerando i 100 anni di vita del glucagone, la mole di ricerche, le acquisizioni in termini di fisiologia e fisiopatologia, unitamente agli sviluppi della farmacologia clinica che hanno progettato opzioni terapeutiche, sia nel DMT1 che nel DMT2, il cui target è proprio il glucagone, è palese come entrambi i componenti della "Odd Couple" debbano entrare a pieno diritto nella storia della moderna diabetologia clinica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Banting F, Brest CH. The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med.* 1922; 7:251-766.
2. Murlin J, Clogh H, Gibbs G, Stokes A. Aequos extracts of the pancreas. Influence on the carbohydrate metabolism of depancreatized animals. *J Biol Chem.* 1923; 56:253-296.
3. Sutherland E, De Duve C. Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J Biol Chem.* 1948; 175:663-674.
4. Bromer W, Sinn S, Staub A, Behrens O. The amino acid sequence of glucagon. *J Am Chem Soc.* 1956; 78:3858-3860.
5. Staub A, Sinn L, Behrens O. Purification and crystallization of glucagon. *J Biol Chem.* 1955; 214:619-632.
6. Kingsley J. Insulin coma therapy in schizofrenia. *J R Soc Med.* 2000; 93:147-149.
7. Unger R, Eisentraut A, McCall M, Madison L. Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion. *J Clin Invest.* 1962; 41:682-689.
8. Robertson RP. Brief overview: glucagon history and physiology. *J Endocrinol.* 2023; 258:e220224.
9. Fanelli CG, Porcellati F, Rossetti P, Bolli GB. Glucagon: the effects of its excess and deficiency on insulin action. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006; 16:S28-S34.
10. Lund A, Bagger JL, Albrechtsen NJW, Christensen M, Grøndhal M, Hartmann B, Mathiesen ER, Hansen CP, Storkholm JH, van Hall G, Rehfeld JF, Hornburg D, Meisner F, Mann M, Larsen S, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK. Evidence of extrapancreatic glucagon secretion in man. *Diabetes.* 2016; 65(3):585-597.
11. Polonsky KS, Herold KC, Gilden JL, Bergenstal RM, Fang VS, Moossa AR, Jaspan JB. Glucose counterregulation in patients after pancreatectomy: comparison with other clinical forms of diabetes. *Diabetes.* 1984;33(11):1112-1119.
12. Samalos E, Tyler JM, Marks V. Glucagon-insulin interrelationships. In: Lefèbvre PJ, Unger RH, editors. *Glucagon: molecular physiology, clinical and therapeutic implications.* New York: Pergamon Press; 1972; 61-75.
13. Asplin CM, Paquette TL, Palmer JP. In vivo inhibition of glucagon secretion by paracrine beta cell activity in man. *J Clin Invest.* 1981; 68:314-318.
14. Greenbaum CJ, Havel PJ, Taborsky GJ, Klaff LJ. Intra-islet insulin permits glucose to directly suppress pancreatic A cell function. *J Clin Invest.* 1991; 88:767-773.

15. Hope KM, Tran POT, Zhou H, Oseid E, LeRoy E, Robertson RP. Regulation of alpha cell function by beta cell in isolated human and rat islets deprived of glucose: the "switch-off" hypothesis. *Diabetes*. 2004; 53:1488-1495.
16. Zhou H, Tran POT, Yang S, Zhang T, LeRoy E, Oseid E, Robertson RP. Regulation of alpha cell function by the beta cell during hypoglycemia in Wistar rats: the "switch-off" hypothesis. *Diabetes*. 2004; 53:1482-1487.
17. Del Prato S, Castellino P, Simonson DC, DeFronzo RA. Hyperglucagonemia and insulin-mediated glucose metabolism. *J Clin Invest*. 1987; 79:547-756.
18. Liljenquist JE, Bomboy JD, Lewis SB, Sinclair-Smith BC, Felts PW, Lacy WW, Crofford OB, Liddle GW. Effects of glucagon on lipolysis and ketogenesis in normal and diabetic men. *J Clin Invest*. 1974; 53:190-197.
19. De Feo P, Perriello G, Torlone E, Fanelli CG, Ventura MM, Santeusano F, Brunetti P, Gerich JE, Bolli GB. Evidence against important catecholamine compensation for absent glucagon counterregulation. *Am J Physiol*. 1991; 260:E203-12.
20. Bolli GB. From physiology of glucose counterregulation to prevention of hypoglycaemia in type I diabetes mellitus. *Diabetes Nutr Metab*. 1990; 4:333-349.
21. Cryer PE. Iatrogenic hypoglycaemia as a cause of hypoglycaemia-associated autonomic failure in IDDM. A vicious cycle. *Diabetes*. 1992; 41:255-260.
22. Fanelli CG, Epifano L, Rambotti AM, Pampanelli S, Di Vincenzo A, Modarelli F, Lepore M, Annibale B, Ciofetta M, Bottini P, Porcellati F, Scionti L, Santeusano F, Brunetti P, Bolli GB. Meticulous prevention of hypoglycemia normalizes the glycemic thresholds and magnitude of most neuroendocrine responses to, symptoms of and cognitive function during hypoglycemia in intensively treated patients with short-term IDDM. *Diabetes*. 1993; 42:1683-1689.
23. Gerich J, Langlois M, Noacco C, Karam J, Forsham P. Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes: Evidence for an intrinsic pancreatic alpha-cell defect. *Science*. 1973; 182:171.
24. Bolli GB, De Feo P, Compagnucci P, Cartechini MG, Angeletti G, Santeusano F, Brunetti P, Gerich JE. Abnormal glucose counterregulation in insulin-dependent diabetes mellitus. Interaction of anti-insulin antibodies and impaired glucagon and epinephrine secretion. *Diabetes*. 1983; 32:134-141.
25. Kuhara T, Ikeda S, Ohneda A, Sasaki Y. Effects of intravenous infusion of 17 amino acids on the secretion of Gh, glucagon and insulin in sheep. *Am J Physiol*. 1991; 260:E21-E26.
26. Caprio S, Tamborlane WV, Zych K, Gerow K, Sherwin RS. Loss of potentiating effect of hypoglycemia on the glucagon response to hyperaminoacidemia in IDDM. *Diabetes*. 1993; 42:550-555.
27. M'bemba J, Cynober L, de Bandt P, Taverna M, Chevalier A, Bardin C, Slama G, Selam JL. Effects of dipeptide administration on hypoglycaemic counterregulation in type 1 diabetes. *Diabetes Metab*. 2003; 29(4 Pt 1):412-417.
28. Porcellati F, Pampanelli S, Rossetti P, Busciantella Ricci N, Marzotti S, Lucidi P, Santeusano F, Bolli GB, Fanelli CG. Effect of the amino acid alanine on glucagon secretion in non-diabetic and type 1 diabetic subjects during hyperinsulinaemic euglycaemia, hypoglycaemia and post-hypoglycaemic hyperglycaemia. *Diabetologia*. 2007; 50(2):422-430.
29. Wiethop BV, Cryer PE. Alanine and terbutaline in treatment of hypoglycemia in IDDM. *Diabetes Care*. 1993; 16:1131-1136.
30. Porcellati F, Pampanelli S, Rossetti P, Cordoni C, Marzotti S, Scionti L, Bolli GB, Fanelli CG. Counterregulatory hormone and symptom responses to insulin-induced hypoglycemia in the postprandial state in humans. *Diabetes*. 2003; 52:2774-2783.
31. Rossetti P, Porcellati F, Ricci NB, Candeloro P, Cioli P, Sreekumaran KN, Santeusano F, Bolli GB, Fanelli CG. Effect of oral amino acids on counterregulatory responses and cognitive function during insulin-induced hypoglycemia in nondiabetic and Type 1 diabetic people. *Diabetes*. 2008; 57(7):1905-1917.
32. American Diabetes Association Professional Practice Committee. Glycemic goals and hypoglycemia: Standard of Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 2024; 47(Suppl 1):S111-S125.
33. Elliott L, Fidler C, Ditchfield A, Stissing T. Hypoglycemia event rates: a comparison between Real-World Data and Randomized Controlled Trial populations in insulin-treated diabetes. *Diabetes Ther*. 2016; 7:45-60.
34. Gerich JE, Mookan M, Veneman T, Korytkowski M, Mitrakou A. Hypoglycemia unawareness. *Endocr Rev*. 1991; 12:356-371.

35. Geddes J, Schopman JE, Zammit NN, Frier BM. Prevalence of impaired awareness of hypoglycaemia in adults with Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2008; 25:501-504.
36. Olsen SE, Asvold BO, Frier BM, Aume SE, Hansen LI, Bjorgaas MR. Hypoglycaemia symptoms and impaired awareness of hypoglycaemia in adults with Type 1 diabetes. The association with diabetes duration. *Diabet Med*. 2014; 31:1210-1217.
37. Lawrence RD. Insulin hypoglycaemia changes in nervous manifestation. *Lancet*. 1941; 238, 602.
38. Cryer P. Hypoglycemia in diabetes: pathophysiology, prevalence, and prevention. 3rd ed. American Diabetes Association: Alexandria, Egypt, 2016; 3-8.
39. Dagogo-Jack SE, Philip E, Cryer MD. Seminal contributions to the understanding of hypoglycemia and glucose counterregulation and the discovery of HAAF (Cryer Syndrome). *Diabetes Care*. 2015; 38:2193-2199.
40. Dagogo-Jack SE, Craft S, Cryer PE. Hypoglycemia-associated autonomic failure in insulin-dependent diabetes mellitus. Recent antecedent hypoglycemia reduces autonomic responses to, symptoms of, and defense against subsequent hypoglycemia. *J Clin Invest*. 1993; 91:819-828.
41. Henderson JN, Allen KV, Deary JJ, Frier BM. Hypoglycaemia in insulin-treated Type 2 diabetes: frequency, symptoms and impaired awareness. *Diabet Met*. 2003; 20:1016-1021.
42. Seaquist ER, Miller ME, Bonds DE, Feinglos M, Goff DC Jr., Peterson K, Senior P, Investigators A. The impact of frequent and unrecognized hypoglycemia on mortality in the ACCORD study. *Diabetes Care*. 2012; 35:409-414.
43. Porcellati F, Di Mauro S, Mazzieri A, Scamporrino A, Filippello A, De Fano M, Fanelli CG, Purrello F, Malaguarnera R, Piro S. Glucagon as a therapeutic approach to severe hypoglycemia: after 100 years, is it still the antidote of insulin? *Biomolecules*. 2021; 11, 1281.
44. Kedia N. Treatment of severe diabetic hypoglycemia with glucagon: an underutilized therapeutic approach. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2011; 4:337-346.
45. Thieu VT, Mitchell BD, Varnado OJ, Frier BM. Treatment and prevention of severe hypoglycaemia in people with diabetes: current and new formulations of glucagon. *Diabetes Obes Metab*. 2020; 22:469-479.
46. Yale JF, Dulude H, Egeth M, Piche CA, Lafontaine M, Carballo D, Margolies R, Dissinger E, Shames AR, Kplowitz N, Zhang MX, Zhang S, Guzman CB. *Diabetes Technol Ther*. 2017; 19:423-432.
47. Sherr JL, Ruedy KJ, Foster NC, Piche CA, Dulude H, Rickels MR, Tamborlane WV, Bethin KE, DiMeglio LA, Fox LA, Wadwa RP, Schartz DA, Nathan BM, Marcovina SM, Rampakakis E, Meng L, Beck RW; T1D Exchange Intranasal Glucagon Investigators. Glucagon nasal powder: a promising alternative to intramuscular glucagon in youth with Type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2016; 39(4):555-562.
48. Pontiroli AE, Alberetto M, Secchi A, Dossi G, Bosi I, Pozza G. Insulin given intranasally induces hypoglycaemia in normal and diabetic subjects. *Br Med J*. 1982; 284:303-306.
49. Pontiroli AE, Alberetto M, Pozza G. Metabolic effects of intranasally administered glucagon: comparison with intramuscular and intravenous injection. *Acta Diabetol Lat*. 1985; 22:103-110.
50. Guzman CB, Dulude H, Piche C, Rufiange M, Sadoune AA, Rampakakis E, Carballo D, Triest M, Zhang MX, Zhang S, Tafreshi M, Sicard E. Effects of common cold and concomitant administration of nasal decongestant on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of nasal glucagon in otherwise healthy participants: a randomized clinical trial. *Diabetes Obes Metab*. 2018; 20(3):646-653.
51. Rickels MR, Ruedy KJ, Foster NC, Piche CA, Dulude H, Sherr JL, Tamborlane WV, Bethin KE, DiMeglio LA, Wadwa RP, Ahmann AJ, Haller MJ, Nathan BM, Marcovina SM, Rampakakis E, Meng L, Beck RW; T1D Exchange Intranasal Glucagon Investigators. *Diabetes Care*. 2016; 39(2):264-270.
52. Matsuhisa M, Takita Y, Nasu R, Nagai Y, Ohwaki K, Nagashima H. Nasal glucagon as a viable alternative for treating insulin-induced hypoglycaemia in Japanese patients with type 1 or type 2 diabetes: a phase 3 randomized crossover study. *Diabetes Obes Metab*. 2020; 22:1167-1175.
53. Seaquist ER, Anderson J, Childs B, Cryer P, Dagogo-Jack S, Fish L, Heller SR, Rodriguez H, Rosenzweig J, Vigersky R. Hypoglycemia and diabetes: a report of a workgroup of the American Diabetes Association and the Endocrine Society. *Diabetes Care*. 2013; 36:1384-1395.

54. Valentine V, Newswanger B, Prestrelski S, Andre AD, Garibaldi M. Human factors usability and validation studies of glucagon autoinjector in a simulated severe hypoglycemia rescue situation. *Diabetes Technol Ther.* 2019; 21:522-530.
55. Xu B, Tang G, Chen Z. Dasiglucagon: an effective medicine for severe hypoglycemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2021; 77(12):1783-1790.
56. Wilson LM, Castle JR. Stable liquid glucagon: beyond emergency hypoglycemia rescue. *J Diabetes Sci Technol.* 2018; 12:847-853.
57. Hawkes CP, De Leon DD, Rickels MR. Novel preparations of glucagon for the prevention and treatment of hypoglycemia. *Curr Diabetes Rep.* 2019; 19, 97.
58. Blauw H, Onvlee AJ, Klaassen M, van Bon AC, De Vries JH. Fully closed loop glucose control with a bihormonal artificial pancreas in adults with type 1 diabetes: an outpatient, randomized, crossover trial. *Diabetes Care.* 2021; 44:836-838.
59. El-Khatib FH, Balliro C, Hillard MA, Magyar KL, Eklaspour L, Sinha M, Mondesir D, Esmaili A, Hartigan C, Thompson MJ, Malkani S, Lock JP, Harlan DM, Clinton P, Frank E, Wilson DM, DeSalvo D, Norlander L, Ly T, Buckingham BA, Diner J, Dezube M, Young LA, Goley A, Kirkman MS, Buse JB, Zheng H, Selagamsetty RR, Damiano ER, Russel SJ. Home use of a bihormonal bionic pancreas versus insulin pump therapy in adults with type 1 diabetes: a multicentre randomised crossover trial. *Lancet.* 2017; 389(10067):369-380.
60. Castellanos LE, Balliro CA, Sherwood JS, Jafri R, Hillard MA, Greaux E, Selagamsetty R, Zheng H, El-Khatib FH, Damiano ER, Russel SJ. Performance of the insulin-only iLet bionic pancreas and the bihormonal iLet using Dasiglucagon in adults with type 1 diabetes in a home-use setting. *Diabetes Care.* 2021; 44(6):e118-e120.
61. Frank JW, Camilleri M, Thomforde GM, Dinneen SF, Rizza RA. Effects of glucagon on postprandial carbohydrate metabolism in nondiabetic humans. *Metabolism.* 1998; 47:7-12.
62. Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia.* 1995; 38:337-343.
63. Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA. Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:4053-4059.
64. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Meier JJ. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art. *Mol Metab.* 2021; 46:101102.
65. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Pfeiffer AFH. The evolving story of incretins (GIP and GLP-1) in metabolic and cardiovascular disease: a pathophysiological update. *Diabetes Obes Metab.* 2021; 23(Suppl 3):5-29.
66. Meier JJ, Deacon CF, Scmhidt WE, Holst JJ, Nauck MA. Suppression of glucagon secretion is lower after oral glucose administration than during intravenous glucose administration in human subjects. *Diabetologia.* 2007; 50:806-813.
67. Nauck MA, Heimesaat MM, Ørskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993; 91:301-307.
68. Christensen MB, Calanna S, Holst JJ, Visboll T, Knop FK. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide: blood glucose stabilizing effects in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99:E418-E426.
69. Mentis N, Vardarli I, Köthe LD, Holst JJ, Deacon CF, Theodorakis M, Meier JJ, Nauck MA. GIP does not potentiate the antidiabetic effects of GLP-1 in hyperglycemic patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2011; 60(4):1270-1276.
70. Frias JP, Nauck MA, Van J, Kutner ME, Cui X, Benson C, Urva S, Gimeno RE, Milicevic Z, Robins D, Haupt A. Efficacy and safety of LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist, in patients with type 2 diabetes: a randomised, placebo-controlled and active comparator-controlled phase 2 trial. *Lancet.* 2018; 392(10160):2180-2193.
71. Thomas MK, Nikooienejad A, Bray R, Cui X, Wilson J, Duffin K, Milicevic Z, Haupt A, Robins DA. Dual GIP and GLP-1 receptor agonist tirzepatide improves beta-cell function and insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021; 106(2):388-396.
72. Novikoff A, Muller TD. The molecular pharmacology of glucagon agonists in diabetes and obesity. *Peptides.* 2023; 165:171003.
73. Al-Massadi O, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R, Quinones M. Glucagon control on food intake and energy balance. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(16). 3905.
74. Muller TD, Finan B, Clemmensen C, DiMarchi RD, Tschöp MH. The new biology and pharmacology of glucagon. *Physiol Rev.* 2017; 97:721-766.

75. Geary N. Pancreatic glucagon signals postprandial satiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990; 14:323-338.
76. Inokuchi A, Oomura Y, Nishimura H. Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behaviour. *Physiol Rev.* 1984; 33:397-400
77. Kleinert M, Sachs S, Habegger KM, Hofmann SM, Muller TD. Glucagon regulation of energy expenditure. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(21):5407.
78. Samols E, Marri G, Marks V. Promotion of insulin secretion by glucagon. *Lancet.* 1965; 286:415-416.
79. Suppli MP, Bagger JI, Lund A, Demant M, van Hall G, Strandberg C, Kønig MJ, Rigbolt K, Langhoff JL, Wever Albrechtsen NJ, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK. Glucagon resistance and the level of amino acid turnover in obese subjects with hepatic steatosis. *Diabetes.* 2020; 69(6):1090-1099.
80. Galsgaard KD, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ, Wever Albrechtsen NJ. Glucagon receptor signaling and lipid metabolism. *Front Physiol.* 2019; 10:413.
81. Rosenstock J, Frias J, Jastreboff AM, Du Y, Lou J, Gurbuz S, Thomas MK, Hartman ML, Haupt A, Milicevic Z, Coskun T. Retatrutride, a GIP-GLP-1 and glucagon receptor agonist, for people with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo and active-controlled, parallel-group, phase 2 trial conducted in the US. *Lancet.* 2023; 402(10401):529-544.
82. Jastreboff AM, Kaplan LM, Frias JP, Wu Q, Du Y, Gurbuz S, Coskun T, Haupt A, Milicevic Z, Hartman ML, for the Retatrutride Phase 2 Obesity Trial Investigators. Triple-hormone-receptor agonist retatrutride for obesity. *N Engl J Med.* 2023; 389:514-526.
83. Melson E, Ashraf U, Papamargaritis D, Davies MJ. What is the pipeline for future medications for obesity? *Int J Obes (Lond).* 2024.