



## DETERMINATION OF BILASTINE IN BIOLOGICAL MATERIAL – ANALYSIS OF A FATAL CASE

Joanna GIEROŃ

*Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

### Abstract

Bilastine is a potent and highly selective  $H_1$ -antihistamine approved for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and urticaria. The increasing incidence of allergic diseases has resulted in an intensive search for new drugs with minimal side effects. Bilastine is generally well tolerated, even when administered at above therapeutic doses. This drug has been sold in Poland as a second-generation antihistamine since 2010. In 2016 the first case of determination of bilastine in biological material was recorded at the Institute of Forensic Research in Krakow. This article presents the blood, urine and tissue concentrations of bilastine. Liquid-liquid extraction was applied for the isolation of bilastine from biological materials. Analyses were carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode. As a result of the analyses, bilastine was determined at concentrations of 335 ng/mL in blood, and 433 ng/mL in urine, as well as 4600 ng/mL and 6700 ng/g in stomach decomposition fluid and tissue respectively, and 560 ng/mL and 245 ng/g in liver decomposition fluid and tissue, respectively. Very limited literature data and lack of information on therapeutic, toxic and lethal concentrations mean that bilastine should be determined in forensic cases in order to estimate these values and simplify further data interpretations.

### Keywords

Antihistamines; Post-mortem concentration; Bilastine; LC-MS/MS; Blood analysis.

*Received 20 March 2020; accepted 31 March 2020*

### 1. Introduction

Anti-histamines (especially second-generation drugs) constitute the basic group of drugs used in symptomatic therapy of allergic diseases. Due to the widespreadness of allergies and the fact that some anti-histamines are available without a prescription, they are used by many people from various age groups. An important problem is the fact that information on the active substances contained in these drugs is not updated on an ongoing basis in the leaflets attached to the drugs, so patients taking the drugs are not fully aware of the possible side effects, including the risks that can be caused, for example, by driving a motor vehicle under their influence. Many of the second generation antihistamines, such as ceterizine, are metabolites of first generation drugs (in this case hydroxyzine). Lev-

oceterizine, in turn, is an isomer of ceterizine; rupatadine and loratadine metabolize to desloratadine, while fexofenadine is the metabolite of terfenadine, a drug that has been withdrawn from the market due to its cardiotoxic effects.

Bilastine (IUPAC nomenclature: 2-[4-(2-{4-[1-(2-ethoxyethyl)-1-benzimidazol-2-yl]piperidin-1-yl}ethyl)phenyl]-2-methylpropanoic acid) is a separate antihistamine drug of the second generation. It is structurally similar to fexofenadine (Fig. 1), but is neither a metabolite nor an isomer of any known antihistamine drug. It has a high affinity for the  $H_1$  histamine receptor and only a trace affinity for other amine and peptide receptors. The affinity for the  $H_1$  receptor is about three times greater than that of ceterizine and five times greater than that of fexofenadine. This translates into a reduction in the risk of adverse reactions

compared to first-generation antihistamines, which are characterized by low selectivity and act not only on the  $H_1$  receptor, but also on muscarinic receptors, adrenergic alpha receptors, serotonin receptors and potassium channels. Unlike first generation antihistamines, bilastine does not penetrate the blood-brain barrier and does not block the  $H_1$  receptor in the central nervous system (CNS) (Dymura, Woroń, Skowroński, 2013; Kuna et al., 2016; Mattila, Paakka, 1999). Second generation antihistamines, in particular bilastine and fexofenadine, are substrates for P-glycoprotein. When they try to overcome the CNS barrier, they are actively removed by P-glycoprotein. Bilastine also exhibits both receptor and non-receptor activity – showing additional anti-inflammatory effects independent of the  $H_1$  receptor and other histamine receptors. Other major advantages of this substance which are important in pharmacotherapy include limited lipophilicity and long biological half-life. Lipophilicity is significant when setting doses for obese patients (doses do not have to be increased), while long biological half-life is important in maintaining the therapeutic effect of the drug as long as possible. Bilastine is used in allergic, seasonal and year-round rhinitis, in urticaria (hives), in the therapy of itching, as well as in the allergic form of (bronchial) asthma, and in angioedema (as a drug supporting the action of epinephrine). Scientific conclusions from periodic safety update reports (PSURs) on bilastine have shown that its administration, however, may cause the following adverse reactions at unknown frequencies: palpitations, tachycardia, hypersensitivity reactions, including breathing difficulties, dizziness, collapse or loss of consciousness, swelling of the face, lips, tongue or throat and (or) swelling and redness of the skin. These reactions have been observed since the medicine was introduced onto the market (European Medicines Agency, Annex I, 2017). Currently, bilastine is used in about 100 countries around the world, mainly by adults and children over 12 years old. In Europe it is also prescribed to children over 6 years of age (Bosma, van den Bor, Vischer, Labeaga, Leurs, 2018; Church, Tiongco-Recto, Ridolo, Novák, 2020). In Poland, bilastine is available in the form of preparations called “Bilaxten” (tablets) and “Clatra” (tablets, syrup).

The aim of the present study was to develop a method for determination of bilastine in biological material and to discuss the first case in Poland in which the presence of this substance was demonstrated in autopsy material.

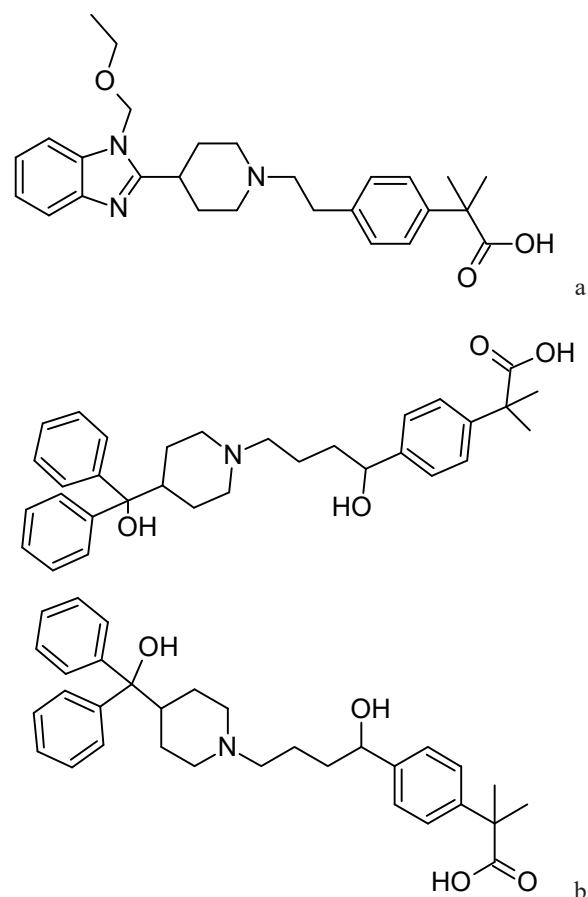


Fig. 1. Chemical structures of bilastine (a) and enantiomers of fexofenadine (b).

### 1.1. Pharmacokinetics

After oral administration of a single dose, bilastine is rapidly absorbed, reaching a maximum plasma concentration of approximately 220 ng/ml (median value) after just 1–1.5 hours. The bioavailability after oral administration has been determined to be 61%, but with a decrease of about 30% when the drug is taken together with grapefruit juice and/or food. In therapeutic doses, 84–90% of bilastine is bound to plasma proteins. Taking successive therapeutic doses does not cause accumulation of the drug. Based on the analysis of blood samples taken from 48 individuals, the maximum plasma concentration of bilastine in the first 24 hours after taking a 20 mg dose was 990 ng/ml (Church et al., 2020). Analyses carried out on a group of 9 healthy men who were taking bilastine at doses of 10, 20 and 50 mg showed that its concentration in blood remained at a measurable level up to 72 hours after taking the drug. The highest concentrations were recorded during the first 6 hours. After 18 hours a slow decrease in blood concentrations to be-

low 10 ng/ml is observed until 0.1–1 ng/ml is reached (after 72 hours; Togawa, Yamaya, 2016). Most of the administered dose is excreted unchanged: 33% with urine, 67% with faeces. In vitro studies have shown that bilastine is not metabolized in the liver, does not activate nor block the activity of cytochrome P450 nor intestinal enzymes (CYP1A4, CYP3A4). Curves of bilastine absorption and elimination determined on the basis of population studies of 310 healthy individuals indicate that it is subject to a two-compartmental model and pharmacokinetics of the first order (Krause, Spohr, Zuberbier, Maurer, 2013; Baselt, 2014; Togawa, Yamaya, 2016; Reményi et al., 2018). Bilastine interacts with: rifampicin, ritonavir, ketoconazole, erythromycin, P-glycoprotein inhibitors, diltiazem, lorazepam and alcohol.

## 2. Case description

The body of a 22-year-old man was found in a car. The autopsy report stated that the death resulted from acute cardiopulmonary failure, the cause of which could not be determined in the autopsy. Among other things, cerebral and pulmonary oedema and congestion of internal organs were demonstrated. No traumatic or pathological changes were found. An investigation conducted concerning contact with drugs and/or new psychoactive substances yielded a negative result. No drug packaging was found in the car. The man had been suffering from a food allergy to fish protein for a long time, and as a result was undergoing desensitization treatment with a modified fish allergen in increasing doses, and receiving supportive treatment. He was only taking bilastine (Clatra 20 mg) and salbutamol (Ventolin 0.1 mg/dose). Post-mortem material in the form of blood, urine, stomach and liver samples was sent in for analysis.

## 3. Methods

### 3.1. Materials and reagents

Salbutamol and papaverine were purchased from Merck (Warsaw, Poland), and bilastine from Clearsynth Labs (Mallapur, India). Acetonitrile (MeCN), ethyl acetate and formic acid (98–100%) were also obtained from Merck (Warsaw, Poland). Neogen immuno-enzymatic tests were purchased from STI (Warsaw, Poland), and standard substances for immunoenzymatic tests (amphetamines, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 11-nor-delta-9-tetrahydrocan-

nabinolic acid (THCCOOH), clonazepam, morphine, and benzoylecgonine) and papaverine were purchased from Sigma-Aldrich Sp. z o.o. (Poznań, Poland).

Control blood samples (free from analytes) used to develop and validate the method came from a blood donation centre. Screening tests of this blood did not reveal the presence of narcotics or drugs, including bilastine, salbutamol and new psychoactive substances (NPS). The biological material was stored at -20°C.

### 3.2. Screening analyses

Due to the circumstances of the event, chemical and toxicological analyses of the blood sample for the presence of carbon monoxide hemoglobin (carboxy-hemoglobin) and ethyl alcohol were performed first. The analyses did not show carbon monoxide saturation corresponding to a concentration above 10% in relation to total haemoglobin, nor did they show the presence of ethyl alcohol at a concentration above 0.1 per mille.

Blood and urine were then tested for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances from the amphetamine group (including MDMA), benzodiazepines, cannabinoids, cocaine and opioids. The analyses were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using tests produced by Neogen. As a result of these analyses, no positive reading was obtained for any of the mentioned groups. Screening for NPS was carried out using a previously published method (Adamowicz, Tokarczyk, 2015), which did not show the presence of NPS in blood and urine.

Blood and urine were also screened for the content of drugs with various effects on the human body (including antihistamine, analgesic, antipsychotic, anti-anxiety and hypnotic (soporific) action), as well as for the active ingredients of the drugs Clatra (bilastine) and Ventolin (salbutamol) mentioned in the court request. Screening for the presence of antihistamines was performed using a previously presented method (Gieroń, Suchan, Adamowicz, Lechowicz, 2018).

In screening analyses, blood and urine samples were extracted separately with ethyl acetate from an alkaline environment (pH 9), and with diethyl ether from an acidic environment (pH 3). The extracts obtained were subjected to screening tests using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with spectrophotometric detection (DAD series detector) and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS).

The performed blood and urine analyses showed the presence of bilastine; and in urine with the ELISA method, small amounts of salbutamol were additional-

ly revealed, whose concentration was estimated at the level of 4 ng/ml.

### 3.3. Determination of bilastine

#### 3.3.1. Preparation of samples for analysis

Papaverine was added as an internal standard (IS) to samples of blood and urine, gastric and liver decomposition fluid, and gastric and liver homogenates (0.2 ml or g each) in Eppendorf vials so as to reach an IS concentration of 100 ng/ml. Then 200  $\mu$ l of 0.5 M carbonate buffer (pH 9) and 1 ml of ethyl acetate were added to the samples. The samples were shaken for 30 s and then centrifuged for 5 min at 13 000 rpm (15.682  $\times$  g), after which the organic phase (900  $\mu$ l) was transferred to screw cap vials of 2 ml volume, and evaporated until a dry residue was obtained at a temperature of 37°C (for 10–15 min). The residue was dissolved in 100  $\mu$ l of water/MeCN 9 : 1 (v/v) phase with addition of 0.1% formic acid, stirring on a shaker (about 10 s), and then transferred to vial inserts in an automatic sample feeder. At the same time, samples were prepared for the calibration curve in the range 10–1000 ng/ml (Fig. 2).

#### 3.3.2. Apparatus and conditions of analysis

A 1200 series liquid chromatograph coupled with an Agilent Technologies 6460 Triple Quad mass spectrometer was used for determination by liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The apparatus operated in positive

ionization mode (+ESI). Separation was carried out on a Phenomenex Kinetex C18 column (4.6  $\times$  100 mm, 2.6  $\mu$ m). The mobile phase, flowing through the column at 0.5 ml/min, was a mixture of 0.1 % formic acid in MeCN and water (v/v). The following gradient program was applied (in relation to the MeCN content): 0 min – 6%, 2 min – 18%, 7 min – 98%, 12 min – 98%, 16 min – 2%, 20 min – 2%. The total analysis time was 20 minutes. The retention time of bilastine was 7.17 min (retention time relative to papaverine (RRT) 0.973), retention time of salbutamol: 4.76 min (RRT 0.662). Selected transitions (MRM) of ions (m/z) were monitored for which the monitoring time of one MRM pair was 100 ms, as shown in Table 1.

Table 1  
MS/MS parameters of determined compounds

Substance	MRM (m/z)	Fragmentor voltage [V]	Collision energy [V]
<b>bilastine</b>	<b>464.3–272.2</b>	<b>112</b>	<b>40</b>
bilastine	464.3–145.1	112	60
bilastine	464.3–191.1	112	48
salbutamol	240.2–77.0	87	56
salbutamol	240.2–148.0	87	12
<b>salbutamol</b>	<b>240.2–222.0</b>	<b>87</b>	<b>4</b>
papaverine (IS)	340.2–202.0	125	21
<b>papaverine (IS)</b>	<b>340.2–324.0</b>	<b>125</b>	<b>29</b>

The table contains MRM transitions applied both in quantitative analysis (bold) and confirmatory transitions, together with collision energies and fragmentor

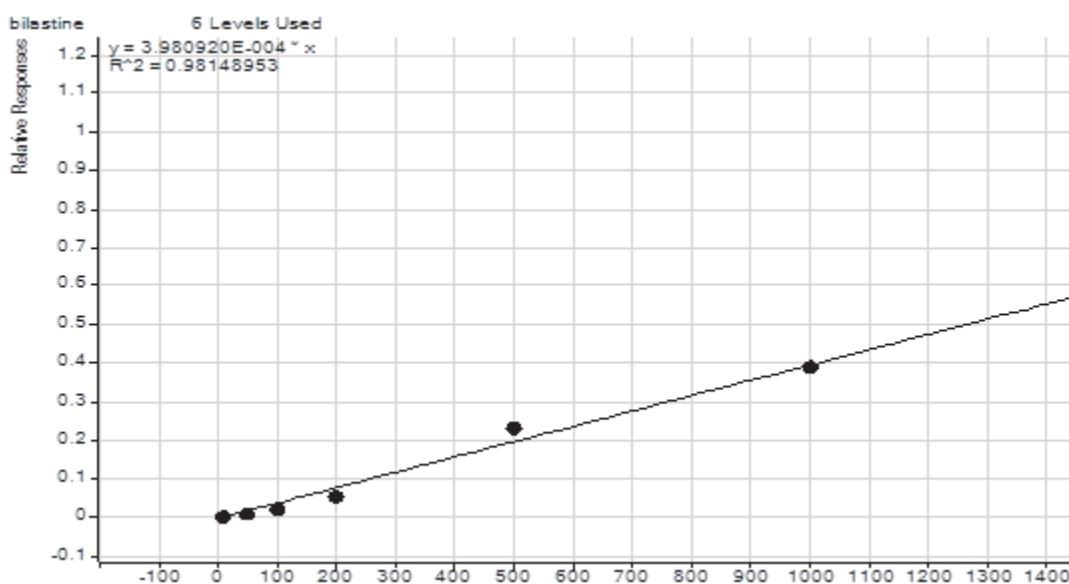


Fig. 2. Calibration curve of bilastine in the range of 10–1000 ng/mL.

voltages. The other parameters of the mass detector were as follows: capillary voltage: 3000 V, gas (nitrogen) flow: 11 l/min, gas temperature: 325°C, shielding gas flow: 10 l/min, shielding gas temperature: 325°C, nozzle pressure: 40 psi. MRM ion chromatograms for bilastine and papaverine obtained for the analysed blood and stomach tissue are presented in Fig. 3. Data collection and analysis were carried out using MassHunter software from Agilent Technologies (version B.04.01).

### 3.3.3. Validation of the method

Validation of the method for the determination of bilastine in blood included, amongst other things, determination of the limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity range, precision, accuracy, recovery and matrix effect (ME). A six-point calibration curve was prepared in the range 10–1000 ng/ml. The LOD was calculated using MassHunter software for a concentration that triggers a detector signal (S) three times higher than the noise level (N), for the least intense MRM transition ( $m/z$  464.3 > 191.1). The specificity of the method was determined by analyzing blood samples collected from ten individuals who were not taking bilastine (this material came from cases submitted to the Institute of Forensic Research, for which expert analyses had already been completed). Precision and accuracy of determinations during a day and between days were calculated at a concentration of 100 ng/ml ( $n = 5$ ). The extraction efficiency was calculated at 100 ng/ml by comparing the signals (analyte surface area/IS surface area) of bilastine – extracted from blood – with the signal originating from bilastine added to previously pre-extracted blood. The ME at a concentration of 100 ng/ml was calculated by comparing the signals of non-extracted bilastine with the signal of bilastine added to previously pre-extracted blood.

## 4. Results

The applied method of determination of bilastine in blood was validated. The calibration curve was linear over the whole concentration range (Fig. 3) and the LOD and LOQ parameters were 0.3 ng/ml and 1 ng/ml respectively. The method was selective; no interference was observed in the substance retention area ( $RT \pm 3$  min). The extraction efficiency was 85%, while the matrix effect was small: 47%. The determined precision and accuracy values did not exceed 11% and 8.5%, respectively (relative error).

The concentration of bilastine revealed in the analysed blood was 335 ng/ml, in urine 433 ng/ml, in gastric tissue 6700 ng/g, while in liver tissue 245 ng/g. In stomach and liver decomposition fluid, the concentrations were 4600 ng/ml and 560 ng/ml. The estimated concentration of salbutamol in urine was 4 ng/ml. These values are presented in Fig. 4.

## 5. Discussion

Bilastine is a new generation antihistamine drug that has only been present on the pharmaceutical market since 2010. Its use varies depending on the severity of the allergy at various times of the year, and changes in interest in this substance can be observed on the Internet (Fig. 5) on forums devoted to drugs (medicines) and psychoactive substances (Google Trends).

In 2016, the Institute of Forensic Research reported the first case of detection of bilastine in biological material. Tests for the presence of antihistamines are not amongst the routine tests performed on drivers in traffic stops and in road accidents. A note in the police sample collection record concerning medication taken by the stopped driver is then of significant importance. This compound was present in biological material taken from a young man, a driver, who had been treated for a long time for an allergy to fish protein. Blood screening was performed by liquid-liquid extraction and followed by HPLC-DAD and LC-MS/MS. Targeted analyses performed by the LC-MS/MS method did not reveal other drugs in the blood, including ones with antihistamine effects, nor new nor classic psychoactive substances.

To date, there have been few scientific papers that have reported concentrations in autopsy material. Doses 3–5 times greater than the recommended daily dose are considered toxic. In the case of diphenhydramine, the toxic dose is about 20–40 mg/kg body weight. Children are much more sensitive to toxic effects caused by antihistamines than adults. The first-generation drugs, which exhibit greater capability of inducing sedation than the second generation drugs, are much more toxic than the second generation drugs: a dose of 300 mg of loratadine causes weak toxic effects; by comparison, the lethal dose of chlorpheniramine is 25–50 mg/kg body weight. Taking such doses (of chlorpheniramine) causes strong CNS stimulation, psychosis, convulsions, anticholinergic syndrome, dystonia and others. The same doses of drugs of the second generation do not cause similar symptoms (Reményi et al., 2018; Drugs.com, <https://www.drugs.com/pro/cetirizine.html>).

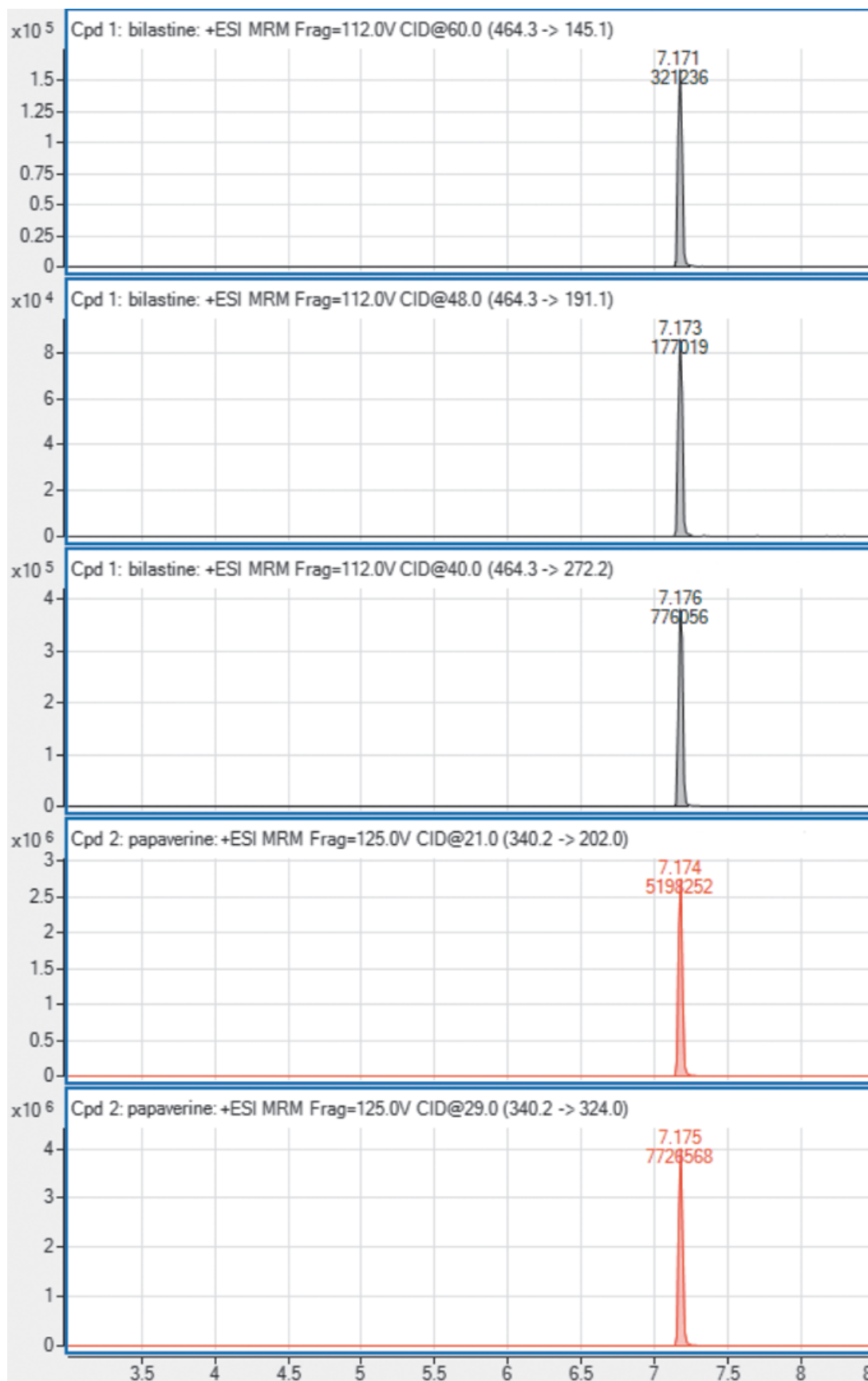


Fig. 3a. MRM chromatograms of bilastine and IS (papaverine) in analysed blood sample.

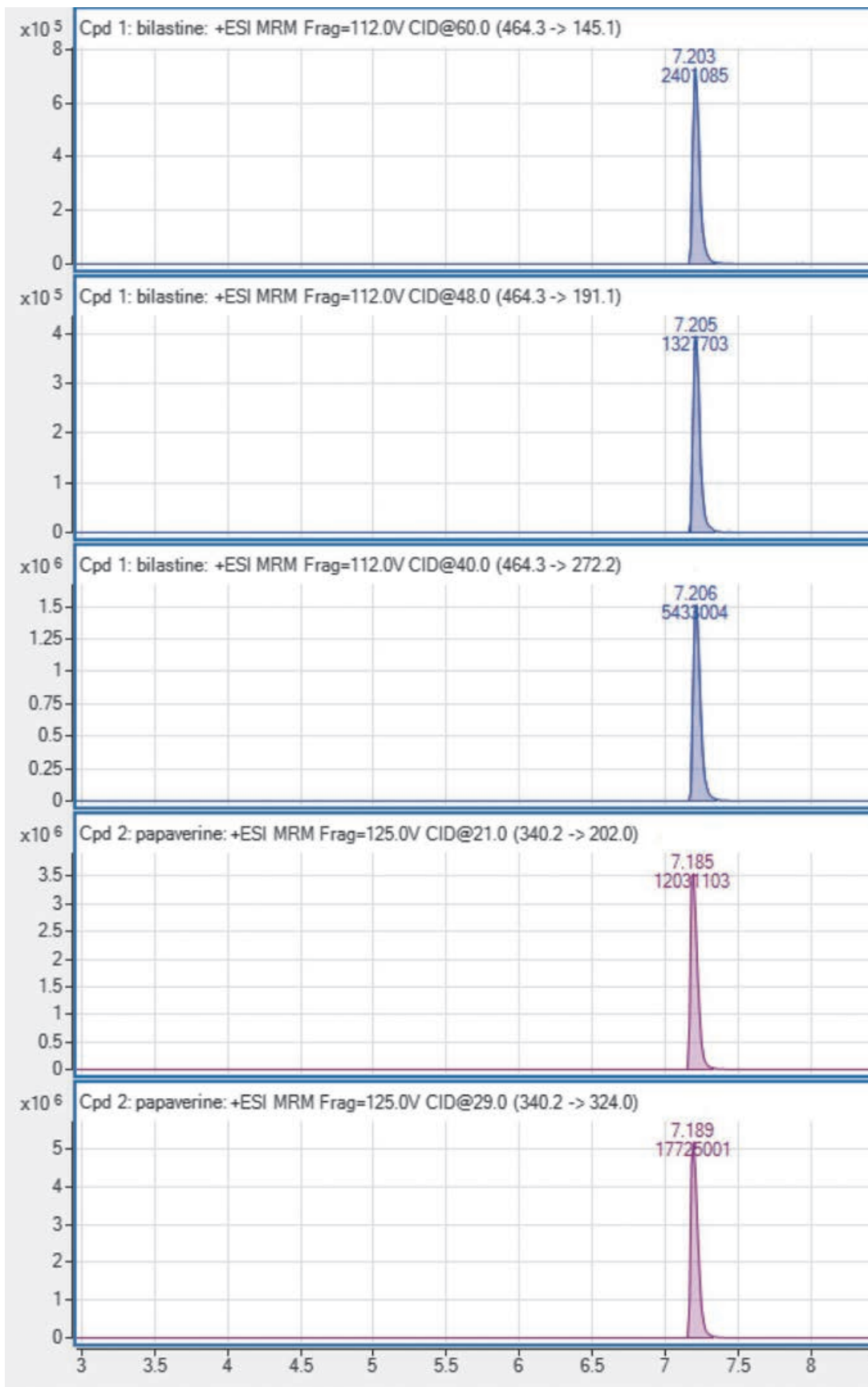


Fig. 3b. MRM chromatograms of bilastine and IS (papaverine) in analysed stomach sample.

One of the papers (Chodorowski, Sein Anand, Kujawska, 2004) describes a case of fatal poisoning by cetirizine of an 18-year-old woman who had suffered with anorexia for two years. The woman was admitted with symptoms of severe poisoning, metabolic acidosis, hypokalaemia, and convulsions. She admitted to taking a high dose (270 mg) of cetirizine for suicidal purposes. Her blood pressure was 70/40 mm Hg, and heart rate 36–40 beats/min. In electrocardiographic

examinations performed on the patient, no prolongation of action potential or QT interval or *torsades de pointes* (TdP) rhythm disturbances were observed. However, hypotonia, bradycardia and convulsions – which had not been noted in the literature at that time – dominated. The unique character of the above mentioned symptoms may have been caused by the fact that the patient exceeded the therapeutic dose of cetirizine by many times together with the coexistence

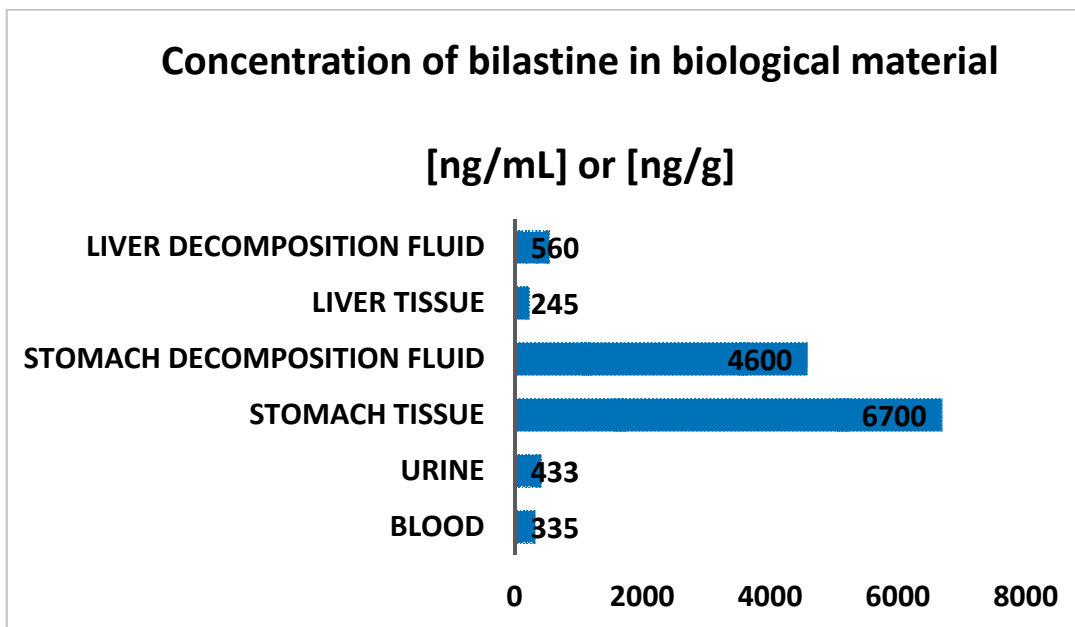


Fig. 4. Concentration of bilastine in biological material.

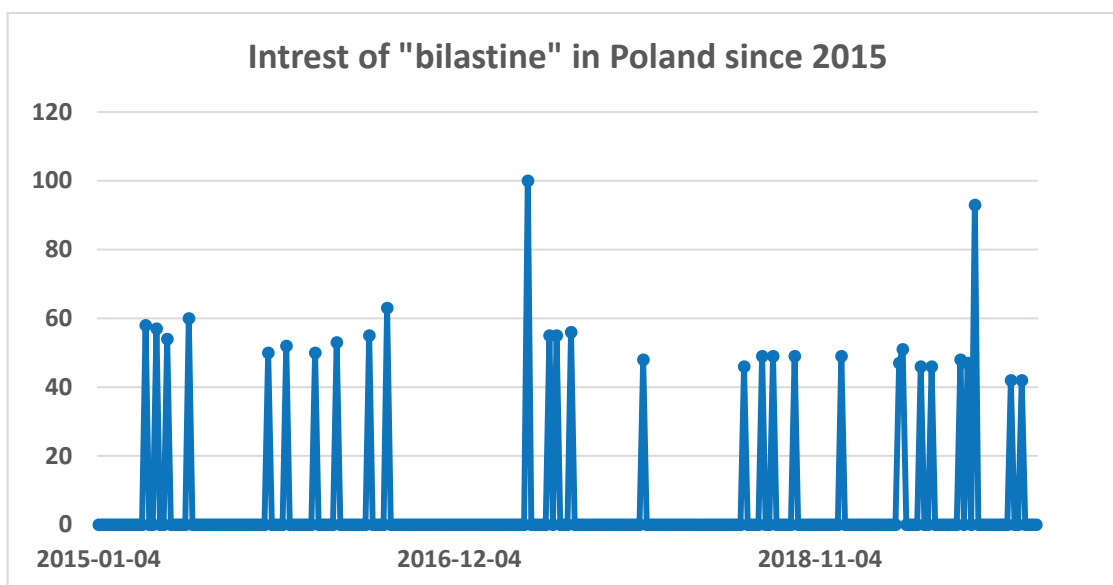


Fig. 5. Interest in the term “bilastine” over time in Poland (01.01.2015–30.12.2019, Google Trends).



of additional factors sensitizing her to its toxicity, i.e. anorexia nervosa and electrolyte disturbances. After 2.5 hours of intensive resuscitation the woman died. Determination of ceterizine in blood taken intravitaly or post-mortem was not performed. In another case, in which an overdose of ceterizine occurred as a result of taking 150 mg of the drug, the only symptom observed was sleepiness (Physician's Desk Reference, 1998). The single dose of ceterizine is 10 mg/day, while the LD50 dose is about 365 mg/kg for rats (Drug Bank; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00341>).

In the case of bilastine, in preclinical trials on laboratory mice and rats, the dose causing death of 50% of the examined animals was estimated at 33–75 mg/kg for intravenous administration, while for oral administration even doses of 2000–5000 mg/kg did not cause death. The drug administered chronically at doses of 40–60 mg/kg/day intravenously (in dogs and rats) and at doses of 800–2000 mg/kg/day orally (in mice, rats and dogs) did not cause symptoms of toxic organ damage during the whole observation period of 52 weeks (Jutel, Solarewicz-Madejek, 2011). In a study described by Crean and colleagues (2007) involving nine healthy men who received 20 mg of bilastine once daily for two weeks, the average plasma bilastine concentration was 232 ng/ml after 1.1 hour for the first dose, and 182 ng/ml after 1.6 h from administration of the last dose. However, the mean bilastine concentration in urine taken from healthy adults taking 20 mg of bilastine per day, as determined by Lasseter et al. (2013), was 4388 ng/ml 12 hours after the last administered dose of the drug. The above data indicate that the blood and urine bilastine levels determined in the case of death described in the present paper result from administration of a therapeutic dose.

## 6. Summary

The article discusses the first case in Poland in which the presence of bilastine was demonstrated in autopsy material. A developed method of determining this compound was used for this purpose. The concentration of bilastine in the blood of the examined man was 335 ng/ml, in urine 433 ng/ml, and in stomach tissue 6700 ng/g, whereas in liver tissue it was 245 ng/g. The literature lacks data on the ranges of therapeutic, toxic and lethal concentrations of bilastine in biological material. On the basis of previous data, it was concluded that bilastine can be considered as a potentially safe substance, including in road traffic. The small amount of data on its effects, concentrations (active, toxic, lethal), as well as interactions, makes it diffi-

cult to determine possible side effects. However, taking into account typical doses of Clatra (20 mg for an adult), the concentrations in biological material quoted from the literature, the high bioavailability and lack of literature reports on the symptoms of drug accumulation, the demonstrated concentrations should not be assessed as high, and health and life threatening. In the case presented here, the cause of death remains unknown, but it can be concluded with high probability that it was not due to bilastine poisoning.

## References

1. Adamowicz, P., Tokarczyk, B. (2015). Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 8(7), 652–667.
2. Baselt, R. C. (2014). *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. Eleventh edition. Biomedical Publications, 250.
3. Cetrizine prescribing information (1998). (In) *Physician's Desk Reference*, 52<sup>nd</sup> ed. (pp. 2234–2236). Montvale: Medical Economics Company.
4. Bosma, R., van den Bor, J., Vischer, H. F., Labeaga L., Leurs R. (2018). The long duration of action of the second generation antihistamine bilastine coincides with its long residence time at the histamine H(1) receptor. *European Journal of Pharmacology*, 5(838), 107–111.
5. Chodorowski, Z., Sein Anand, J., Kujawska, H. (2004). Fatal suicidal intoxication with cetirizine in patient with anorexia-a case report. *Przegląd Lekarski*, 61(4), 433–434.
6. Church, M. K., Tiongco-Recto, M., Ridolo, E., Novák, Z. (2020). Bilastine: a lifetime companion for the treatment of allergies. *Current Medical Research and Opinion*, 36(3), 445–454.
7. Crean, C. S., Roupe, K. R., Sologuren, A., Valiente, R. (2007). The pharmacokinetics of bilastine after single and 14 day once daily administration. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*, 101 (Suppl. 1), 148.
8. Drug Bank. Retrieved 31 December 2019 from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00341>.
9. Drugs-forum. Retrieved 31 December 2019 from: <https://drugs-forum.com/>.
10. Dymura, K., Woroń, J., Skowroński, A. (2013). Leki a prowadzenie pojazdów. *Bezpieczeństwo, teoria i praktyka*, 3(12), 51–62.
11. European Medicines Agency, Aneks I, Wnioski naukowe i podstawy zmiany warunków pozwolenia (pozwoleń) na dopuszczenie do obrotu. Retrieved 31 December 2019 from: [https://www.ema.europa.eu/documents/psusa/bilastine-cmdh-scientific-concactions-grounds-variation-amendments-product-information-timetable/00003163/201703\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/psusa/bilastine-cmdh-scientific-concactions-grounds-variation-amendments-product-information-timetable/00003163/201703_en.pdf).

12. Gieron, J., Suchan, M., Adamowicz, P., Lechowicz, W. (2018). Method for the determination of selected antihistamine drugs in blood. Poster presentation at 56<sup>th</sup> The International Association of Forensic Toxicologists meeting 2018, Ghent, Belgium, August 26–29, 2018.
13. *Google Trends*. Retrieved 31 December 2019 from: <https://www.google.com/trends>.
14. Jutel, M., Solarewicz-Madejek, K., (2011). Bilastyna – nowy lek przeciwhistaminowy. *Alergia*, 3, 37–39.
15. Krause, K., Spohr, A., Zuberbier, T., Church, M. K., Maurer, M. (2013). Up-dosing with bilastine results in improved effectiveness in cold contact urticaria. *Allergy*, 68, 921–928.
16. Kuna, P., Jurkiewicz, D., Czarnecka-Operacz, M., Pawliczak, R., Woron, J., Moniuszko, M., Emeryk, A. (2016). Miejsce i kryteria wyboru leków przeciwhistaminowych w leczeniu alergii. Stanowisko ekspertów. *Advances in Dermatology and Allergology*, 33(6), 397–410.
17. Lasseter, K. C., Sologuren, A., Noce, A. L., Dilzer, S. C. (2013). Evaluation of single dose pharmacokinetics of bilastine in subjects with various degrees of renal insufficiency. *Clinical Drug Investigation*, 33, 665–673.
18. Mattila, M. J., Paakka, I., (1999). Variations among non-sedating antihistamines: are there real differences?. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55(2), 85–93.
19. Reményi, Á., Grósz, A., András, S. S., Tótká, Z., Molnár, D., Helfferich, F. (2018). Comparative study of the effect of bilastine and cetirizine on cognitive functions at ground level and at an altitude of 4,000 m simulated in hypobaric chamber: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Expert Opinion on Drug Safety*. Retrieved 31 December 2019 from: DOI: 10.1080/14740338.2018.1502268.
20. Scaglione, F. (2012). *Safety profile of bilastine: 2nd generation H1-antihistamines*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16, 1999–2005.
21. Togawa, M., Yamaya, H., Rodriguez, M., Nagashima, H. (2016). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of bilastine, a second-generation antihistamine in healthy Japanese subjects. *Clinical Drug Investigation*, 36, 1011–1021.

---

**Corresponding author**

dr Joanna Gieron  
Instytut Ekspertyz Sądowych  
ul. Westerplatte 9  
PL 31-033 Kraków  
e-mail: [jgieron@ies.krakow.pl](mailto:jgieron@ies.krakow.pl)

---

## OZNACZANIE BILASTYNY W MATERIALE BIOLOGICZNYM – ANALIZA PRZYPADKU ZGONU

### 1. Wprowadzenie

Leki antyhistaminowe (szczególnie leki II generacji) stanowią podstawową grupę leków stosowanych w objawowej terapii chorób alergicznych. Z uwagi na skalę problemu, a także to, że niektóre dostępne są bez recepty, stosowane są przez ludzi z różnych grup wiekowych. Istotny problem stanowi fakt, że informacje dotyczące substancji aktywnych zawartych w tych lekach nie są na bieżąco aktualizowane w ulotkach załączonych do leków, tak więc pacjenci przyjmujący dane leki nie są do końca świadomi możliwych działań niepożądanych, w tym też zagrożeń, jakie może powodować np. prowadzenie pojazdu mechanicznego przez osoby będące pod ich działaniem. Wiele spośród leków antyhistaminowych II generacji, jak na przykład ceteryzyna, jest metabolitami leków I generacji (w tym przypadku hydroksyzyny). Lewoceteryzyna jest z kolei izomerem ceteryzyny, rupatadyna i loratadyna metabolizują do desloratadyny, natomiast feksofenadyna jest metabolitem terfenadyny – leku, który został wycofany z obrotu ze względu na działanie kardi toksyczne.

Bilastyna (nomenklatura IUPAC: kwas 2-[4-(2-{4-[1-(2-etoksyetylo)-1-benzimidazol-2-yl]piperidyn-1-yl}etylo)fenylo]-2-metylopropionowy) jest odrębnym lekiem przeciwhistaminowym II generacji. Strukturalnie podobna jest do feksofenadyny (Ryc. 1), nie jest jednak ani metabolitem, ani izomerem któregośkolwiek znanego leku antyhistaminowego. Wykazuje wysokie powinowactwo do receptora histaminowego H1 i jedynie słabodowe powinowactwo do receptorów innych amin i peptydów. Powinowactwo do receptora H1 jest około trzy razy większe niż ceteryzyny i pięć razy większe niż feksofenadyny. Przekłada się to na obniżenie ryzyka działań niepożądanych w stosunku do leków przeciwhistaminowych I generacji, które odznaczają się niską selektywnością i działają nie tylko na receptor H1, ale także na receptory muskarynowe, receptory adrenergiczne alfa, receptory serotoninowe oraz kanały potasowe. W odróżnieniu od nich bilastyna nie przenika przez barierę krew-mózg i nie blokuje receptora H1 w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN; Dymura, Woron, Skowronski, 2013; Kuna i in., 2016; Mattila, Paakka, 1999). Leki antyhistaminowe II generacji, w szczególności bilastyna i feksofenadyna, są substratami dla P-glikoproteiny. W sytuacji gdy próbują pokonać barierę OUN, są aktywnie usuwane przez P-glikoproteinę. Bilastyna wykazuje też działanie zarówno receptorowe, jak i pozareceptorowe, odznaczając się dodatkowym działaniem przeciwpalnym niezależnym od receptora H1 i innych recepto-

row histaminowych. Do kolejnych najważniejszych zalet tej substancji, mających znaczenie w farmakoterapii, należą ograniczona lipofilowość oraz długi biologiczny okres półtrwania. Lipofilowość ma znaczenie przy ustalaniu dawek dla osób z otyłością (dawki nie muszą być zwiększane), natomiast długi biologiczny okres półtrwania jest istotny dla utrzymania jak najdłuższego działania terapeutycznego leku. Bilastyna stosowana jest w alergicznym, sezonowym i całorocznym zapaleniu błony śluzowej nosa, w pokrzywce, w terapii świądu skórnoego, a także w uczuleniowej postaci dychawicy oskrzelowej w obrzęku naczynioruchowym (jako lek wspomagający działanie epinefryny). Wnioski naukowe płynące z okresowych raportów o bezpieczeństwie (PSUR) dotyczącym bilastyny wykazały, że jej przyjmowanie jednak może powodować następujące działania niepożądane o nieznanym częstości: kołatanie serca, częstoskurcz, reakcje nadwrażliwości, w tym trudności w oddychaniu, zawroty głowy, zapaść lub utratę świadomości, obrzęk twarzy, warg, języka lub gardła i (lub) obrzęk i zaczerwienienie skóry. Reakcje te obserwowano po wprowadzeniu leku do obrotu (European Medicines Agency, Aneks I, 2017). Obecnie bilastyna stosowana jest w około 100 krajach na świecie, głównie przez osoby dorosłe i dzieci powyżej 12 roku życia. W Europie przepisywana jest również dzieciom powyżej 6 roku życia (Bosma, van den Bor, Vischer, Labeaga, Leurs, 2018; Church, Tiongco-Recto, Ridolo, Novák, 2020). W Polsce bilastyna dostępna jest w postaci preparatów o nazwie „Bilaxten” (tabletki) i „Clatra” (tabletki, syrop).

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody oznaczania bilastyny w materiale biologicznym oraz omówienie pierwszego w Polsce przypadku, w którym wykazano obecność tej substancji w materiale sekcyjnym.

#### 1.1. Farmakokinetyka

Po przyjęciu doustnym pojedynczej dawki bilastyna jest szybko absorbowana, osiągając już po 1–1,5 godziny maksymalne stężenie w osoczu krwi wynoszące około 220 ng/ml (wartość wyznaczona za pomocą mediany). Biodostępność po podaniu doustnym określono na 61%, przy czym maleje ona o około 30% przy łącznym przyjmowaniu leku z sokiem grejpfrutowym i/lub pożywieniem. W dawkach terapeutycznych 84–90% bilastyny wiąże się z białkami osocza. Przyjmowanie kolejnych dawek terapeutycznych nie powoduje kumulacji leku. Wyznaczone na podstawie analizy próbek krwi pobranej od 48 osób maksymalne stężenie bilastyny w osoczu

krwi w ciągu pierwszych 24 godzin od przyjęcia dawki 20 mg wynosiło 990 ng/ml (Church i in., 2020). Badania przeprowadzone na grupie 9 zdrowych mężczyzn, którzy przyjmowali bilastynę w dawkach 10, 20 i 50 mg wykazały, że jej stężenie we krwi utrzymuje się na mierzalnym poziomie do 72 godzin od przyjęcia leku. Najwyższe stężenia odnotowano w ciągu pierwszych 6 godzin. Po upływie 18 godzin obserwuje się powolny spadek stężeń we krwi poniżej 10 ng/ml aż do stężeń 0,1–1 ng/ml (po upływie 72 godzin; Togawa, Yamaya, 2016). Większość przyjętej dawki wydalana jest w postaci niezmienionej: 33% z moczem, 67% z kałem. Badania *in vitro* wykazały, że bilastyna nie jest metabolizowana w wątrobie, nie aktywuje ani też nie blokuje aktywności cytochromu P450, jak i enzymów jelitowych (CYP1A4, CYP3A4). Określone na podstawie badań populacji 310 zdrowych osób krzywe absorpcji i eliminacji bilastyny wskazują, że podlega ona modelowi dwukompartmencowemu i farmakokinetyce I rzędu (Krause, Spohr, Zuberbier, Maurer, 2013; Baselt, 2014; Togawa, Yamaya, 2016; Reményi i in., 2018). Bilastyna wchodzi w interakcje z: ryfampicyną, rytonawirem, ketokonazolem, erytromycyną, inhibitorami P-glikoproteiny, diltiazemem, lorazepamem i alkoholem.

## 2. Opis przypadku

W samochodzie zostały ujawnione zwłoki 22-letniego mężczyzny. W protokole z sekcji zwłok stwierdzono, że zgon nastąpił wskutek ostrej niewydolności krążeniowo-oddechowej o niedającej się sekcyjnie ustalić przyczynie. Wykazano m.in. obrzęk mózgu i płuc oraz przekrwienie narządów wewnętrznych. Nie stwierdzono zmian urazowych oraz chorobowych. Wywiad przeprowadzony odnośnie do kontaktu z narkotykami i/lub nowymi substancjami psychoaktywnymi dał wynik ujemny. W samochodzie nie ujawniono opakowań po narkotykach. Mężczyzna od dłuższego czasu cierpiał na alergię pokarmową na białko ryb, w związku z czym poddawany był odczulaniu zmodyfikowanym alergenem ryby w rosnących dawkach i leczeniu podtrzymującym. Przyjmował jedynie bilastynę (Clatra 20 mg) oraz salbutamol (Ventolin 0,1 mg/dawkę). Do badań nadesłano materiał sekcyjny w postaci próbek krwi, moczu, a także wycinków żołądka i wątroby.

## 3. Metody

### 3.1. Materiały i odczynniki

Salbutamol i papawerynę zakupiono w firmie Merck (Warszawa, Polska), bilastynę – w firmie Clearsynth Labs (Mallapur, Indie). Acetonitryl (MeCN), octan etylu

i kwas mrówkowy (98–100%) pochodziły również z firmy Merck (Warszawa, Polska). Testy immunoenzymatyczne firmy Neogen zakupiono w firmie STI (Warszawa, Polska), a substancje wzorcowe do testów immunoenzymatycznych (amfetaminy, 3,4-metylenodioksymetamfetaminy (MDMA), kwasu 11-nor-delta-9-tetrahydrokannabinolowego (THCCOOH), klonazepamu, morfiny, benzoilokgoniny) oraz papawerynę zakupiono w firmie Sigma-Aldrich Sp. z o.o. (Poznań, Polska).

Próby krwi kontrolnej (wolnej od analitów) stosowane do opracowania i walidacji metody pochodziły ze stacji krwiodawstwa. Badania przesiewowe tej krwi nie ujawniły obecności środków odurzających i leków, w tym bilastyny, salbutamolu i nowych substancji psychoaktywnych (NSP). Materiał biologiczny przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. Analizy przesiewowe

W związku z okolicznościami zdarzenia w pierwszej kolejności wykonano analizę chemiczno-toksykologiczną próby krwi na obecność hemoglobiny tlenkowej (karboksyhemoglobiny) oraz alkoholu etylowego. Analiza nie wykazała wysycenia tlenkiem węgla odpowiadającego stężeniu powyżej 10% w stosunku do hemoglobiny całkowitej, nie wykazała również obecności alkoholu etylowego w stężeniu powyżej 0,1 promila.

Krew i mocz badano następnie na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych z grup amfetamin (w tym MDMA), benzodiazepin, kannabinoli, kokainy i opioidów. Badania wykonano metodą immunoenzymosorbcyjną (ELISA), używając testów firmy Neogen. W wyniku tych analiz nie uzyskano pozytywnego odczytu dla którejkolwiek z wymienionych grup. Badania przesiewowe w kierunku NSP prowadzono wcześniej opublikowaną metodą (Adamowicz, Tokarczyk, 2015), w ich wyniku we krwi i moczu nie wykazano obecności NSP.

Krew i mocz poddano również badaniom przesiewowym na zawartość leków o różnym działaniu na organizm ludzki (w tym o działaniu antyhistaminowym, przeciwbólowym, przeciwpochotycznym, przeciwłękowym i nasennym), a także wymienionych w postanowieniu składników aktywnych leków Clatra (bilastyna) i Ventolin (salbutamol). Badania przesiewowe na obecność leków antyhistaminowych prowadzono wcześniej prezentowaną metodą (Gieroń, Suchan, Adamowicz, Lechowicz, 2018).

W badaniach przesiewowych próbki krwi i moczu ekstrahowano oddzielnie octanem etylu ze środowiska alkalicznego (pH 9) oraz eterem dietylowym ze środowiska kwaśnego (pH 3). Uzyskane ekstrakty poddano badaniom przesiewowym z zastosowaniem metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją spektrofotometryczną (detektor szeregu diod DAD)

i chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS).

Przeprowadzone analizy krwi i moczu wykazały obecność bilastyny, a w moczu metodą immunoenzymosorbcyjną – dodatkowo obecność niewielkich ilości salbutamolu, którego stężenie oszacowano na poziomie 4 ng/ml.

### 3.3. Oznaczenie bilastyny

#### 3.3.1. Przygotowanie próbek do badań

Do prób krwi, moczu, ocieklin żołądka i wątroby oraz homogenatów żołądka i wątroby (0,2 ml lub g każda) umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano jako wzorzec wewnętrzny (IS) papawerynę, aby osiągnąć stężenie 100 ng/ml. Następnie do próbek dodawano 200  $\mu$ l 0,5 M buforu węglanowego (pH 9) oraz 1 ml octanu etylu. Próby wytrząsano przez 30 s, a następnie wirowano przez 5 min przy 13 000 obr./min ( $15,682 \times g$ ), po czym fazę organiczną (900  $\mu$ l) przenoszono do szklanych zakręcanych fiolek o objętości 2 ml i odparowywano do uzyskania suchej pozostałości w temperaturze 37°C (przez 10–15 min). Pozostałość rozpuszczano w 100  $\mu$ l fazy woda/MeCN 9 : 1 (v/v) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego, mieszając na wstrząsarce (około 10 s), a następnie przenoszono do wkładek fiolek w automatycznym podajniku próbek. Równolegle przygotowano próbki dla krzywej kalibracyjnej w zakresie 10–1000 ng/ml (Ryc. 2).

#### 3.3.2. Aparatura i warunki analizy

Do oznaczeń metodą chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) zastosowano chromatograf cieczowy serii 1200 sprzężony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies. Aparat pracował w trybie jonizacji pozytywnej (+ESI). Rozdział prowadzono na kolumnie Kinetex C18 ( $4,6 \times 100$  mm, 2,6  $\mu$ m) firmy Phenomenex. Fazę ruchomą, przepływającą przez kolumnę z szybkością 0,5 ml/min, stanowiła mieszanina 0,1% kwasu mrówkowego w MeCN i wodzie (v/v). Zastosowano następujący program gradientowy (w odniesieniu do zawartości MeCN): 0 min – 6%, 2 min – 18%, 7 min – 98%, 12 min – 98%, 16 min – 2%, 20 min – 2%. Całkowity czas analizy wynosił 20 minut. Czas retencji bilastyny wynosił 7,17 min (względny czas retencji względem papaweryny (RRT) 0,973), czas retencji salbutamolu 4,76 min (RRT 0,662). Monitorowano wybrane przejścia (MRM) jonów (m/z), dla których czas monitorowania jednej pary MRM wynosił 100 ms, co zestawiono w tabeli 1.

Zawiera ona przejścia MRM stosowane zarówno w analizie ilościowej (wytłuszczone), jak i potwierdzające, wraz z energiami kolizji i napięciami fragmentora. Pozostałe parametry detektora masowego były nastę-

pujące: napięcie kapilary: 3000 V, przepływ gazu (azotu): 11 l/min, temperatura gazu: 325°C, przepływ gazu osłonowego: 10 l/min, temperatura gazu osłonowego: 325°C, ciśnienie rozpylacza: 40 psi. Chromatogramy MRM jonów dla bilastyny i papaweryny uzyskane dla badanej krwi oraz badanej tkanki żołądka przedstawiono na ryc. 3. Zbieranie i analizę danych prowadzono za pomocą oprogramowania MassHunter firmy Agilent Technologies (wersja B.04.01).

#### 3.3.3. Walidacja metody

Walidacja metody oznaczania bilastyny we krwi obejmowała m.in. określenie granicy detekcji (LOD), granicy oznaczalności (LOQ), zakresu liniowości, precyzji, dokładności, odzysku i efektu matrycy (ME). Przygotowano sześciopunktową krzywą kalibracyjną w zakresie 10–1000 ng/ml. LOD została obliczona przy zastosowaniu oprogramowania MassHunter dla stężenia wywołującego sygnał detektora (S) trzykrotnie większy niż wysokość szumów (N), dla najmniej intensywnego przejścia MRM (m/z 464,3  $\rightarrow$  191,1). Specyficzność metody określono, analizując próby krwi pobranej od dziesięciu osób nieprzyjmujących bilastyny (materiał ten pochodził z nadsyłanych do IES spraw, w których badania objęte ekspertyzami już zakończono). Precyzję i dokładność oznaczeń w ciągu dnia oraz pomiędzy dniami obliczono dla stężenia 100 ng/ml (n = 5). Wydajność ekstrakcji obliczono przy stężeniu 100 ng/ml poprzez porównanie sygnałów (pole powierzchni analitu/pole powierzchni IS) bilastyny – ekstrahowanego z krwi z sygnałem pochodzącym od bilastyny dodanej do uprzednio przeekstrahowanej krwi. ME przy stężeniu 100 ng/ml obliczono poprzez porównanie sygnałów nieekstrahowanej bilastyny z sygnałem bilastyny pochodzącym od dodanego do uprzednio przeekstrahowanej krwi.

## 4. Wyniki

Zastosowana metoda oznaczania bilastyny we krwi została zwalidowana. Krzywa kalibracyjna była liniowa w całym zakresie stężeń (Ryc. 3), a parametry LOD i LOQ wynosiły odpowiednio 0,3 ng/ml i 1 ng/ml. Metoda była selektywna; nie zaobserwowano żadnych interferencji w obszarze retencji substancji ( $RT \pm 3$  min). Wydajność ekstrakcji wynosiła 85%, natomiast efekt matrycy był niewielki i wynosił 47%. Wyznaczone wartości precyzji i dokładności nie przekraczały odpowiednio 11% i 8,5% (błąd względny).

Wykazane w badanej krwi stężenie bilastyny wynosiło 335 ng/ml, w moczu 433 ng/ml, w tkance żołądka 6700 ng/g, natomiast w tkance wątroby 245 ng/g. W ocieklinach żołądka i wątroby stężenia wynosiły 4600 ng/ml oraz 560 ng/ml. Oszacowane stężenie salbu-

tamolu w moczu wynosiło 4 ng/ml. Zawartości te zilustrowano na ryc. 4.

## 5. Dyskusja

Bilastyna jest lekiem antyhistaminowym nowej generacji obecnym na rynku farmaceutycznym dopiero od 2010 roku. Jej zastosowanie zmienia się w zależności od nasilenia alergii w różnych porach roku i zmiany zainteresowania tą substancją można zaobserwować w Internecie (Ryc. 5) na forach poświęconych lekom i substancjom psychoaktywnym (Google Trends).

W 2016 roku odnotowano w Instytucie Ekspertyz Sądowych pierwszy przypadek wykrycia bilastyny w materiale biologicznym. Badania na obecność leków antyhistaminowych nie należą do rutynowych badań wykonywanych w przypadkach kierowców zatrzymanych do kontroli i w wypadkach drogowych. Zapis w protokole pobrania materiału dotyczący przyjmowanych leków ma wówczas istotne znaczenie. Związek ten był obecny w materiale biologicznym pobranym od młodego mężczyzny, kierowcy, który od dłuższego czasu leczył się z powodu alergii na białko ryb. Badania przesiewowe krwi przeprowadzono metodą ekstrakcji ciecz-ciecz, a następnie analizami HPLC-DAD i LC-MS/MS. Analizy ukierunkowane wykonane metodą LC-MS/MS nie ujawniły we krwi innych leków, także tych o działaniu antyhistaminowym ani nowych, ani klasycznych substancji psychoaktywnych.

Do chwili obecnej niewiele powstało prac naukowych, które raportowałyby stężenia w materiale sekcyjnym. Za toksyczne uznawane są dawki 3–5 razy większe niż zalecana dawka dobową. W przypadku difenhydraminy jest to około 20–40 mg/kg masy ciała. Dzieci są znacznie bardziej wrażliwe na efekty toksyczne wywołane przez leki antyhistaminowe niż dorośli. Leki I generacji, wykazujące większą zdolność do wywoływania sedacji niż leki II generacji, są od nich znacznie bardziej toksyczne – dawka 300 mg loratadyny wywołuje słabe efekty toksyczne. Dla porównania dawka śmiertelna chlorfeniraminu wynosi 25–50 mg/kg masy ciała. Przyjęcie takich dawek powoduje wystąpienie silnego pobudzenia OUN, psychozy, konwulsji, zespołu antycholinergicznego, dystonii i innych. Takie same dawki leku II generacji nie powodują podobnych objawów (Reményi i in., 2018; Drugs.com., <https://www.drugs.com/pro/cetirizine.html>).

W jednej z prac (Chodorowski, Sein Anand, Kujawska, 2004) opisano przypadek zatrucia śmiertelnego cetyryzyną 18-letniej kobiety chorej od dwóch lat na anoreksję. Kobietę przyjęto z objawami silnego zatrucia, kwasicy metaboliczną, hipokaliemią, konwulsjami. Przyznała się do przyjęcia dużej dawki (270 mg) cetyryzyny w celach samobójczych. Ciśnienie krwi wynosiło 70/40

mm Hg, tętno 36–40 uderzeń/min. W badaniach elektrokardiograficznych wykonanych u pacjentki nie obserwowano wydłużenia potencjału czynnościowego i odstępu QT oraz zaburzeń rytmu typu *torsades de pointes* (TdP). Dominowały natomiast nieodnotowywane wówczas w piśmiennictwie hipotonia, bradykardia oraz drgawki. Unikalny charakter powyższych objawów mógł być spowodowany wielokrotnym przekroczeniem przez chorą terapeutycznej dawki cetyryzyny przy współistnieniu dodatkowych czynników uczulających na jej toksyczność, a więc jadłowstrętu psychicznego oraz zaburzeń gospodarki elektrolitowej. Po 2,5 godzinach intensywnej reanimacji kobieta zmarła. Oznaczenia cetyryzyny we krwi pobranej przyżyciowo bądź *post-mortem* nie wykonywano. W innym przypadku, w którym przedawkowanie cetyryzyny nastąpiło wskutek przyjęcia 150 mg leku, jedynym zaobserwowanym objawem była senność (Physician's Desk Reference, 1998). Dawka jednorazowa cetyryzyny wynosi 10 mg/dzień, natomiast dawka LD50 wynosi około 365 mg/kg dla szczurów (Drug Bank; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00341>).

W przypadku bilastyny w badaniach przedklinicznych na myszach i szczurach laboratoryjnych dawkę powodującą śmierć 50% badanych zwierząt oszacowano na 33–75 mg/kg przy podaniu dożylnym, natomiast przy podaniu doustnym nawet dawki 2000–5000 mg/kg nie powodowały zgonów. Lek podawany przewlekle w dawkach 40–60 mg/kg/dobę dożylnie (u psów i szczurów) oraz w dawkach 800–2000 mg/kg/dobę (u myszy, szczurów i psów) nie powodował objawów toksycznego uszkodzenia narządów przez cały okres obserwacji wynoszący 52 tygodnie (Jutel, Solarewicz-Madejek, 2011). W opisanych przez Crean i współpracowników (2007) badaniach przeprowadzonych z udziałem dziewięciu zdrowych mężczyzn, którzy przez dwa tygodnie raz dziennie otrzymywali 20 mg bilastyny, średnie stężenie bilastyny w osoczu wynosiło 232 ng/ml po upływie 1,1 godz. w przypadku przyjęcia pierwszej dawki i 182 ng/ml po 1,6 godz. od przyjęcia ostatniej dawki leku. Wyznaczone natomiast przez Lasseter i współpracowników (2013) średnie stężenie bilastyny w moczu pobranym od zdrowych dorosłych osób przyjmujących 20 mg bilastyny dziennie wynosiło 4388 ng/ml po upływie 12 godzin od przyjęcia leku. Powyższe dane wskazują, że wyznaczone w niniejszym przypadku zgonu stężenia bilastyny we krwi i moczu wynikają z przyjęcia dawki terapeutycznej.

## 6. Podsumowanie

W artykule omówiono pierwszy na terenie Polski przypadek, w którym wykazano obecność bilastyny w materiale sekcyjnym. W tym celu została zastosowana opracowana metoda oznaczania tego związku. Wykazane we krwi mężczyzny stężenie bilastyny wyno-

siło 335 ng/ml, w moczu 433 ng/ml, w tkance żołądka 6700 ng/g, natomiast w tkance wątroby 245 ng/g. W piśmiennictwie brak danych na temat zakresów stężeń terapeutycznych, toksycznych i śmiertelnych bilastyny w materiale biologicznym. Na podstawie dotychczasowych danych uznano, że bilastyna może być rozpatrywana jako substancja potencjalnie bezpieczna, także w ruchu drogowym. Niewielka ilość danych na temat jej działań, stężeń (aktywnych, toksycznych, śmiertelnych), jak również interakcji, powoduje problem z określeniem ewentualnych skutków działań niepożądanych. Niemniej jednak biorąc pod uwagę typowe dawki Clatry (20 mg dla osoby dorosłej), przywołane z piśmiennictwa stężenia w materiale biologicznym oraz dużą biodostępność i brak doniesień literaturowych na temat objawów kumulacji leku, wykazanych stężeń nie należy oceniać jako wysokich, zagrażających zdrowiu i życiu. W przedstawionym tu przypadku przyczyna zgonu w dalszym ciągu pozostaje nieznana, ale z wysokim prawdopodobieństwem można stwierdzić, że nie był on spowodowany zatruciem bilastyną.