

Kemoterapi temozolomide pada glioblastoma multiforme

Temozolomide chemotherapy for glioblastoma multiforme

Fidha Rahmayani*, Pernodjo Dahlan**, Subagya**

*Departemen Neurologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung, Lampung

**Departemen Neurologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Keywords:

Glioblastoma multiforme, temozolomide, MGMT, methylation

Glioblastoma multiforme is the most common astrocytoma subtype in adult with the average incidence 3.2 new cases per 100.000 per year. This tumour has natural characteristic as aggressive, infiltrative and destructive whose giving variable symptoms depend on size of tumour; location, mass effect and increase intracranial pressure. The current standard of care for newly diagnosed GBM patients includes surgery, radiotherapy and adjuvant temozolomide (TMZ).

Chemotherapy concomitant and adjuvant with TMZ treatment conferring a median survival time of 14.6 months compared with 12.1 months for patients receiving radiotherapy alone. TMZ is an imidazotetrazine derivate, has cytotoxic effect by methylates DNA specific position. TMZ is an orally available and rapidly absorbed intact, penetrates blood brain barrier and highly concentrated in cerebrospinal fluid.

One of the major challenges coming from temozolomide chemotherapy is resistancy to this alkylating agents. Mechanism of resistance to alkylating agents is mediated by the DNA repair enzyme O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) which repairs O-methylguanine adducts DNA result repair DNA lesion. MGMT promoter methylation status play an important role for predict respons of tumour GBM treated with TMZ so could be a strong prognostic biomarker in GBM.

ABSTRAK

Kata kunci:

Glioblastoma multiforme, temozolomide, MGMT, metilasi

Glioblastoma multiforme (GBM) adalah subtype astrositoma yang paling sering dijumpai pada dewasa dengan rerata insiden sebanyak 3,2 kasus baru per 100.000 penduduk per tahun. Tumor ini memiliki sifat dasar agresif, sangat invasif dan destruktif pada jaringan otak dan mengakibatkan manifestasi klinis yang bervariasi tergantung pada lokasi anatomis tumor, efek masa, serta peningkatan tekanan intrakranial. Standar penatalaksanaan GBM yang saat ini digunakan adalah dengan operasi reseksi, dilanjutkan dengan radioterapi dan kemoterapi.

Kemoterapi concomitant dan adjuvant dengan menambahkan temozolomide sepanjang dan setelah radioterapi menjadi terapi standar GBM sejak tahun 2005, yang dapat meningkatkan rerata kelangsungan hidup dari 12,1 bulan menjadi 14,6 bulan. Temozolomide adalah generasi kedua dari derivat imidazotetrazine, yang memiliki efek sitotoksik dengan mekanisme kerja memetilasi situs DNA spesifik. TMZ dikonsumsi per oral dan diabsorpsi secara cepat, menembus sawar darah otak, dan mencapai konsentrasi yang tinggi di dalam cairan otak.

Salah satu permasalahan kemoterapi TMZ adalah resistensi terhadap alkylating agent ini yang diperantarai protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). Mekanisme kerja protein ini adalah melepas gugus metil dari posisi O6-guanin pada basa DNA sehingga terjadi perbaikan lesi DNA. Pada GBM, status metilasi promotor gen protein ini memiliki peranan untuk menentukan respons sel tumor terhadap kemoterapi zat pengalkil dan dapat memprediksi keberhasilan kemoterapi TMZ pada pasien. Selain itu status metilasi promotor gen MGMT dapat digunakan sebagai dasar pemilihan terapi GBM, sehingga status metilasi MGMT dapat digunakan sebagai biomarker prognostik dan prediktif pada GBM yang diterapi dengan TMZ.

Correspondence:

fidhazone60@gmail.com

PENDAHULUAN

Glioma adalah tumor otak yang berasal dari sel glia yang paling sering ditemukan, dengan angka kejadian sekitar 51% dibandingkan dengan tumor otak primer yang lain. Astrocitoma adalah tipe tumor tersering dari glioma dengan frekuensi kejadian >75%.¹ Berdasarkan data Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS), *Glioblastoma multiforme* (GBM) adalah subtipe astrocitoma yang paling sering dijumpai pada dewasa, dengan rerata insiden sebanyak 3,2 kasus baru per 100.000 penduduk per tahun.² Angka kejadian GBM meningkat seiring dengan pertambahan usia. Sepertiga total GBM terjadi pada usia lebih dari 65 tahun, sedangkan puncak insiden terjadi antara usia 65 sampai dengan 84 tahun. Tumor ini lebih sering terjadi pada laki-laki dengan rasio bervariasi antara 1,06 sampai 2.³

Glioblastoma multiforme memiliki gambaran histopatologis yang membedakannya dengan glioma *grade* lainnya, yaitu gambaran pleomorfik-hiperseluler dengan diferensiasi buruk, nukleus polimorfik dengan kemampuan mitotik tinggi, proliferasi mikrovaskular yang menyebabkan peningkatan aliran darah di sekitar tumor serta gambaran nekrosis. World Health Organization (WHO) menggolongkan tumor ini ke dalam astrocitoma *grade* IV yang menjadi penyebab 3-4% dari seluruh angka kematian terkait kanker.⁴

Glioblastoma multiforme memiliki manifestasi klinis yang bervariasi tergantung pada lokasi anatomis tumor, efek masa, serta peningkatan tekanan intrakranial. Gejala yang paling sering muncul adalah nyeri kepala dan kejang, sedangkan tanda neurologis yang paling sering ditemukan adalah hemiparesis, papiledema, gangguan mental, dan afasia.⁵

Penatalaksanaan kasus GBM sangat bervariasi dan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain ukuran tumor, letak tumor, penyebaran tumor, serta *Karnofsky Performance Status* (KPS). Standar penatalaksanaan GBM yang saat ini digunakan adalah dengan operasi reseksi, dilanjutkan dengan radioterapi dan kemoterapi.⁶ Pembedahan tumor bertujuan untuk konfirmasi histopatologis dan mengurangi massa tumor yang menekan otak.⁷

Kemoterapi *concomitant* dan *adjuvant* dengan menambahkan temozolomide sepanjang dan setelah radioterapi menjadi terapi standar GBM sejak tahun 2005, yang dapat meningkatkan rerata ketahanan hidup dari 12,1 bulan menjadi 14,6 bulan.⁸ Temozolomide (TMZ) adalah zat pengalkil yang bersifat sitotoksik dan dapat menembus sawar darah otak dengan baik dengan pemberian secara oral.⁷ Mekanisme kerja TMZ dengan memetilasi situs DNA spesifik.

Penelitian terkini dalam European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)–National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC)

berhasil menyimpulkan bahwa penambahan TMZ selama radioterapi yang disebut sebagai *concomitant therapy*, diikuti 6 siklus bulanan TMZ yang dikenal dengan *adjuvant therapy* menghasilkan penambahan kelangsungan hidup yang signifikan dengan efek samping toksisitas yang cukup rendah pada pasien GBM.⁶

Salah satu permasalahan kemoterapi TMZ adalah resistensi terhadap zat pengalkil ini, sehingga diperlukan faktor prediktor keberhasilan kemoterapi TMZ, yaitu status metilasi gen promotor *methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase* (MGMT). Protein MGMT adalah protein yang berfungsi untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi pada DNA. Pada GBM, status metilasi protein ini memiliki peranan untuk menentukan respons sel tumor terhadap kemoterapi zat pengalkil dan dapat memprediksi keberhasilan terapi TMZ pada pasien. Selain itu, status metilasi MGMT dapat digunakan sebagai dasar pemilihan terapi GBM, sehingga status metilasi MGMT dapat digunakan sebagai biomarker prognostik dan prediktif pada GBM yang diterapi dengan TMZ.⁹ Tinjauan pustaka ini bertujuan untuk mempelajari kemoterapi TMZ pada GBM.

Glioblastoma multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM) adalah tumor otak primer kelompok neuroepitel tersering dan tergolong neoplasma paling ganas. Frekuensi GBM sekitar 12-16% dari seluruh tumor intrakranial dan sekitar 54% dari seluruh tumor glioma. Insidensi GBM di negara-negara Eropa dan Amerika Utara berkisar antara 2-3 per 100.000 penduduk per tahun, sedangkan kejadian di Amerika Serikat menunjukkan insidensi sebesar 4,1 per 100.000 penduduk per tahun.¹⁰

GBM sering menyerang regio supratentorial, yaitu lobus frontal, temporal, parietal, dan oksipital serta jarang berlokasi di serebelum dan medula spinalis. Studi pada populasi di Los Angeles melaporkan insiden tumor ini tersering di lobus frontal diikuti lobus temporal dan parietal.²

GBM merupakan kelompok tumor yang dikenal sebagai astrocitoma. Astrocitoma diklasifikasikan menjadi *low grade* dan *high grade* menurut WHO. Klasifikasi ini digunakan salah satunya untuk menentukan prognosis, seperti astrocitoma lokal (*low grade astrocytomas*), antara lain *pilocytic astrocytoma*, *subependymal giant cell astrocytoma* dan *pleomorphic xanthoastrocytoma* mempunyai prognosis yang baik, sedangkan *high grade astrocytoma* memiliki prognosis yang buruk.¹¹

Tumor ini dapat timbul cepat secara *de novo*, tanpa lesi prekursor yang kemudian disebut sebagai glioblastoma primer. Di sisi lain, glioblastoma sekunder berkembang secara perlahan dari astrocitoma yang difus

(WHO grade II) atau *anaplastic astrocytoma* (WHO grade III).¹¹ Kriteria primer dan sekunder memiliki perbedaan dalam hal jalur genetik, usia pasien yang terkena dan perbedaan pada luaran. GBM primer menempati 80% dari seluruh kasus dan biasanya tampak pada pasien yang lebih tua (>50 tahun), dengan gambaran sebagai tumor agresif, sangat invasif, dan biasanya dengan riwayat perjalanan klinis penyakit yang cepat, kurang dari tiga bulan. GBM sekunder memiliki riwayat klinis yang berbeda. Tumor ini biasanya tampak pada pasien yang lebih muda (<45 tahun) dimulai dari astrositoma derajat rendah dan berkembang menjadi GBM dalam kurun waktu 5-10 tahun sejak diagnosis.

Manifestasi klinis GBM bervariasi serta bergantung pada usia pasien, lokasi tumor, ukuran tumor, dan tingkat pertumbuhan tumor. Tanda dan gejala tumor tersebut dapat berupa tanda fokal yang didasarkan pada lokasi anatomis tumor tersebut atau berupa tanda umum akibat peningkatan tekanan intrakranial dan efek massa.¹² Gejala yang paling sering ditemukan pada penderita GBM adalah nyeri kepala dengan persentase 56%. Nyeri kepala biasanya hilang timbul, tumpul, dan tidak berdenyut. Gejala ini hampir serupa dengan nyeri kepala tipe tegang dan masih dapat dibedakan melalui riwayat perjalanan penyakit. Dengan adanya peningkatan tekanan intrakranial maka nyeri kepala dapat diperberat dengan batuk bersin mengejan atau diprovokasi dengan menggunakan *valsava maneuver* serta ditemukan keluhan mual dan muntah. Apabila ditemukan gejala peningkatan tekanan intrakranial maka perlu untuk segera dilakukan pemeriksaan *neuroimaging*.

Gejala lain yang memerlukan penegakan diagnosis dengan *neuroimaging* adalah kejang pertama kali tanpa ada riwayat epilepsi sebelumnya. Kejang ditemukan pada 32% pasien GBM diikuti 10-20% ditemukan pada tumor maligna saraf pusat lainnya. Perubahan status mental terjadi pada 16-34% pasien GBM. Biasanya anggota keluarga menyadari perubahan status mental dari konsentrasi, memori, afek, kepribadian, atau inisiatif yang berkurang. Perubahan ini lebih nyata dibandingkan perubahan yang dialami pasien demensia sehingga memerlukan evaluasi lebih dalam. Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa 5-8% pasien GBM datang dengan awitan akut seperti stroke (*stroke-like presentation*) akibat adanya perdarahan intrakranial.¹³

Pemeriksaan diagnostik standar baku pada GBM antara lain pencitraan dengan menggunakan *magnetic resonance imaging* (MRI). MRI lebih sensitif untuk identifikasi tumor serta memberikan gambaran anatomis yang lebih detail dibandingkan *CT-scan*. MRI dapat melihat gambaran jaringan lunak dengan lebih jelas dan sangat baik untuk menilai tumor infratentorial, tetapi mempunyai keterbatasan dalam hal menilai kalsifikasi.²

Gambaran MRI memperlihatkan lesi hipointens khas dengan *enhancing rim* pada pemeriksaan *T1-weighted* yang memberikan penyangatan heterogen dengan pemberian kontras. Gambaran *enhancing rim* berasal dari susunan sel neoplasma densitas tinggi dengan abnormalitas permeabilitas pembuluh darah terhadap kontras. Daerah tepi yang menampakkan penyangatan adalah gambaran edema vasogenik yang tersusun dari sejumlah sel yang invasif.¹⁴

Teknik pemeriksaan MRI yang lebih jauh dapat membantu menilai derajat histopatologi glioma dengan menunjukkan perubahan secara fisiologis dan aktivitas metabolik sehingga membantu menentukan *grading* tumor dan digunakan juga untuk evaluasi serta monitor terapi. GBM memiliki karakteristik angiogenesis yang tinggi. Hal ini digunakan salah satunya sebagai sasaran terapi dan sebagai penanda sistem pengklasifikasian secara histologis.¹⁵

Pada pemeriksaan MRI konvensional *T1-weighted*, gambaran nekrosis dapat dengan mudah dilihat dengan penyangatan yang lebih sedikit, memberikan gambaran *rim* yang ireguler. Namun, gambaran nekrosis dapat menjadi perancu pada stadium awal mikronekrosis yang memberikan gambaran penyangatan yang lebih luas atau bahkan tidak didapatkan penyangatan sama sekali. Pemeriksaan *T2-weighted* menunjukkan daerah edema yang luas di sekelilingnya. Pada pemeriksaan *T1-weighted* dengan kontras, penyangatan tumor dapat dibedakan dengan sinyal hipointens edema, tetapi pada pemeriksaan *T2-weighted* edema menjadi hiperintens sehingga tidak dapat dibedakan dengan tumor. Daerah hipodens di tengah menunjukkan adanya nekrosis.¹⁶

Pemeriksaan pencitraan fungsional lainnya seperti *magnetic resonance spectroscopy* (MRS), *positron emission tomography* (PET) pada dasarnya jarang digunakan untuk mendiagnosis GBM. MRS digunakan untuk melihat aktivitas mitotik tumor serta dapat menghitung metabolisme otak dari gambaran peningkatan rasio puncak *choline-creatinin*, peningkatan puncak asam laktat serta penurunan puncak *N-asetilspartate* (NAA). Regio otak dengan tingkat proliferasi yang tinggi menjadi penanda untuk mendapatkan lokasi biopsi yang akurat.¹⁷

Penyebab pasti GBM belum diketahui, tetapi beberapa faktor diduga meningkatkan risiko terjadinya tumor ini. Paparan radiasi telah diketahui memiliki hubungan langsung terhadap perkembangan GBM. Faktor lainnya seperti penggunaan telepon seluler dan paparan terhadap pestisida diduga sebagai faktor risiko terjadinya GBM. Telepon seluler seperti diketahui menghasilkan sejumlah kecil radiasi elektromagnetik *non-ionizing*, tetapi penelitian tentang ini belum menghasilkan bukti yang akurat.¹⁸

Penelitian epidemiologi genetika menunjukkan adanya kasus glioma yang diturunkan. Salah satunya

yang terkait garis familial yang terjadi pada 5% dari keseluruhan kasus glioma. Lebih kurang 1% dari keseluruhan kasus diturunkan secara autosomal dominan, serta 2% diturunkan secara autosomal resesif. Beberapa sindroma yang diturunkan diduga memiliki keterkaitan dengan peningkatan kejadian GBM, antara lain sindroma *nevus* epidermal, sindroma Li-Fraumeni, neurofibromatosis tipe-1, serta sindrom Turcot. Namun demikian, hanya sindroma *nevus* epidermal dan sindrom Li-Fraumeni yang terbukti memiliki keterlibatan dengan peningkatan kejadian GBM, yang didasari dengan mutasi gen p53.³⁴

Sistem saraf pusat pada dewasa diidentifikasi memiliki *neural stem cell* atau sel progenitor glia yang mampu memperbaiki diri sendiri serta berdiferensiasi menjadi astrosit dan neuron sebagai respon terhadap jejas/*injury*. Hal ini mendasari mekanisme neuroplastisitas pada sistem otak. Temuan ini juga mendukung hipotesis bahwa sel progenitor glia awal dapat menjadi sasaran transformasi dalam pembentukan glioma.¹⁹

Mekanisme selanjutnya yang mendasari transformasi glia dengan sifat seperti *stem cell* adalah sel astrosit matur atau sel oligodendrosit matur yang terinduksi mengalami diferensiasi sebagai respon terhadap mutasi genetik. Hipotesis ini didukung beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa sel-sel matur tersebut dapat mengalami diferensiasi sebagai respon terhadap stimulus tertentu, sehingga sel matur dapat menjadi sasaran dalam gliomagenesis. Dalam pembentukan glioma, terjadinya mutasi genetik dapat memungkinkan terjadinya perubahan astrosit menjadi sel yang tidak matur. Sel pada tahapan tersebut masih memiliki kemampuan proliferasi dan migrasi. Kedua kemampuan tersebut merupakan sifat biologis tumor astrositoma.²⁰

Transformasi sel normal menjadi sel kanker melibatkan tiga kelompok gen, yaitu protoonkogen, *tumor suppressor gene* (TSG) dan *mutator gene*. Modifikasi protoonkogen menghasilkan onkogen selular yang menginduksi proliferasi sel. Perubahan ini diseimbangkan oleh TSG yang menghambat proliferasi. *Mutator genes* bekerja dalam replikasi DNA dan integritas gen. Adanya gangguan pada protoonkogen dan *tumor suppressor genes* bertanggung jawab dalam perkembangan GBM.²⁰

Onkogen yang terlibat dalam perkembangan GBM antara lain gen EGFR (*epidermal growth factor receptor*), CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*), PDGFR- α (*platelet-derived growth factor receptor*), dan MDM2 (*murine double minute 2*). TSG berperan sebagai pengatur perlambatan pembelahan sel. TSG yang terlibat dalam perkembangan GBM, antara lain gen TP53, CDKN2A/p16, PTEN (*phosphatase and tensin*) dan RB1 (*retinoblastoma*).²¹

Kemoterapi temozolomide

Standar pengobatan terkini pada kasus GBM adalah reseksi tumor diikuti radioterapi dan kemoterapi dengan menggunakan agen temozolomide.²² Karakteristik GBM adalah pertumbuhannya yang bersifat agresif sehingga hampir tidak mungkin untuk mengangkat tumor secara keseluruhan. Radioterapi dan kemoterapi diperlukan setelah dilakukannya operasi reseksi untuk meningkatkan efikasi pengobatan secara keseluruhan.²³

Beberapa penelitian mengungkapkan adanya peningkatan angka harapan hidup pada pasien GBM yang mendapatkan kemoterapi bersamaan radioterapi dilanjutkan kemoterapi adjuvan. Meta analisis membuktikan terjadi peningkatan 6-10% kelangsungan hidup satu tahun. Pengujian Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 0525 menunjukkan efek terapi pemeliharaan temozolomide yang intensif (siklus 28 hari: 21 hari pengobatan diikuti oleh 7 hari tanpa pengobatan) setelah radioterapi standar ditambah temozolomide dengan aturan pemeliharaan standar (pengobatan 5 hari berurutan tiap siklus 28 hari) pada kelangsungan hidup pasien dengan glioblastoma. Rerata kelangsungan hidup untuk uji kohort tersebut (n=833) adalah 17,7 bulan dan rerata kelangsungan hidup tanpa perkembangan penyakit adalah 8,2 bulan.³

Meta-analisis yang dilakukan Wang *et al.*²⁴ membandingkan rerata kelangsungan hidup secara keseluruhan/*overall survival* (OS) dan kelangsungan hidup tanpa progresivitas/*progression free survival* (PFS) pada GBM kasus baru yang diterapi dengan radioterapi dan TMZ dibandingkan dengan radioterapi saja dalam kurun waktu dari tahun 2005 sampai 2014. Secara keseluruhan meta-analisis ini menunjukkan OS yang lebih lama pada pasien yang mendapat kombinasi radioterapi dan kemoterapi TMZ terutama dalam jangka panjang. Tidak didapatkan perbedaan signifikan pada PFS 6 bulan antara kedua perlakuan, tetapi didapatkan perbedaan signifikan pada PFS 1 tahun dan 2 tahun diantara grup kombinasi radioterapi dan TMZ dibandingkan radioterapi saja (tabel 1).

Agen kemoterapi secara garis besar bersifat sitotoksik dan sitostatik. Kemoterapi menurut asal dan mekanisme kerjanya terbagi menjadi empat golongan yaitu antimetabolit, *alkylating agent*, produk alamiah, dan hormon. Antimetabolit merupakan suatu golongan, senyawa alamiah atau sintetik yang berhubungan dengan unsur dasar asam nukleat sehingga dapat ikut serta dalam sistem transport dan proses metabolik sel sampai akhirnya berujung memblokir proses di dalamnya. *Alkylating agent* meliputi sejumlah turunan *nitrogen mustard* yang memiliki kesamaan ikatan kompleks dengan satu atau dua golongan alkil reaktif yang kemudian akan berikatan dengan basa DNA, terutama kelompok *guanine*. Produk alamiah terutama berfungsi

Tabel 1. Penelitian metaanalisis perbandingan radioterapi ditambah TMZ dibandingkan dengan radioterapi.²⁵

Studi	Jumlah subjek	Usia	Median Survival (95% CI, bulan)	Survival rate (%)	Median progression-free survival (95%CI, bulan)	Progression-free survival rate (%)
Athanassiou, 2005	RT-TMZ: 57 RT: 53	>50: 74% >50: 91%	13,4(9,5-17,1) 7,7(5,3-9,2)	80,2(0,5y),56,3(1y) 58,3(0,5y),15,7(1y)	10,8(8,08-14,69) 5,2(3,94-7,36)	57,9(1y) 17(1y)
Stupp, 2005	RT-TMZ: 287 RT:286	56(19-70) 57(23-71)	14,6(13,2-16,8) 12,1(11,2-13)	86,3(0,5y),61,1(1y), 26,5(2y), 84,2(0,5y), 50,6(1y), 10,4(2y)	6,9(5,8-8,2) 5(4,2-5,5)	53,9(0,5y),26,9(1y), 10,7(2y), 36,4(0,5y), 9,1(1y),10,5(2y)
D.W.K, 2006	RT-TMZ: 22 RT: 16	51,4(20-73)	14,9±10,08 8,3±4,8	NA	10,9±6,14 62±3,68	NA
Kocher, 2008	RT-TMZ: 29 RT: 33	59(34-67) 58(37-69)	14,5(12-17,2) 17,1(13,5-20,8)	NA	6,3(5,1-7,5) 7,6(6,8-8,4)	NA
Stupp, 2009	RT-TMZ: 287 RT: 286	>50: 74% >50: 91%	14,6(13,2-16,8) 12,1(11,2-13)	16(3y),12,1(4y),98(5y) 4,4(3y),3(4y),19(5y)	NA	6(3y),5,6(4y), 4,1(5y) 1,3(3y), 1,3(4y), 1,3(5y)
Muni, 2010	RT-TMZ: 22 RT: 23	63(53-77) 66(55-79)	9,4 7,3	95(0,5y),20(1y) 78(0,5y),5(1y)	5,5 4,4	78(0,5y) 5(0,5y)
Karacetin, 2011	RT-TMZ: 20 RT: 20	NA	19 11,5	NA	13 5	NA
Szczepanek, 2013	RT-TMZ: 28 RT: 30	55(18-65) 56(20-68)	16 12,5	92,3(0,5y),65,4(1y),30,8(1,5y),23,1(2y) 86,7(0,5y),63,3(1y),23,3(1,5y),6,7(2y)	NA	NA
Liu Gang, 2014	RT-TMZ: 28 RT: 30	45,6±6,8 46,7±5,9	NA	86,7(1y), 63,2(2y) 60(1y), 43,3(2y)	NA	NA

menghambat enzim topoisomerase. Kemoterapi hormonal adalah antihormon untuk meniadakan efek stimulasi pertumbuhan hormon alamiah.²⁶

Agen sitotoksik menginduksi kematian sel tumor secara langsung. Mekanisme agen sitotoksik, antara lain melalui alkilasi DNA, DNA *crosslinkage*, DNA *strand break*, dan mengganggu rantai mitosis. Agen sitotoksik lini pertama yang direkomendasi untuk terapi lini pertama GBM berdasarkan studi-studi metaanalisis, uji klinis maupun pedoman adalah TMZ, *carmustine* (BCNU) dan PCV (kombinasi *procarbazine*, *lomustine* (CCNU), dan *vincristine*).²⁷

Penelitian yang dilakukan oleh Stupp *et al.*⁷, membuktikan bahwa pasien GBM berusia lebih dari 60 tahun yang mendapatkan terapi TMZ memiliki angka harapan hidup lebih lama dibandingkan dengan terapi standar radioterapi. Peningkatan harapan hidup ini berhubungan erat dengan status metilasi gen promotor MGMT.

Temozolomide pertama kali disintesis pada tahun 1984. Obat ini merupakan suatu *bicyclic heterocycle* yang secara kimiawi termasuk dalam golongan imidazotetrazinon. Karakteristik struktur kimia golongan ini merupakan gabungan dari suatu cincin imidazole yang berfusi dengan cincin tetrazinon yang mengandung ikatan tiga atom nitrogen. Adanya ikatan tiga atom nitrogen ini memungkinkan efek antitumor TMZ lebih besar dibandingkan dengan zat pengalkil generasi sebelumnya yang hanya memiliki ikatan dua atom nitrogen. Metilasi DNA merupakan mekanisme utama

yang memungkinkan terjadinya efek sitotoksik TMZ terhadap sel ganas.²⁸

Temozolomide tidak memerlukan metabolisme hepar dan konversi enzim untuk berubah menjadi metabolit antitumor potensial *methyltriazen imidazole carboximide* (MTIC) seperti agen kemoterapi lainnya. Uji stabilitas kimiawi menunjukkan bahwa TMZ secara spontan mengalami hidrolisis pada pH di atas 7. Setelah diabsorbsi melalui intestinal, posisi karbon elektropositif C4 dalam cincin tetrazinon akan mudah mengalami katalisis basa nukleofilik oleh air. Cincin ini akan terpecah dan kehilangan karbon dioksida sehingga menghasilkan formasi MTIC yang secara cepat akan mengalami degradasi menjadi bentuk turunan inaktif asam karboksilida, suatu ion kation metildiazonium yang sangat reaktif dan produk akhir *aminoimidazole-carboxamida* (AIC) yang akhirnya akan diekskresikan lewat ginjal. Kation metildiazonium merupakan agen aktif metilasi yang akan memindahkan kelompok metil membentuk rangkaian DNA yang termetilasi. Diantara beberapa pusat nukleofilik, ikatan O6-metilguanin memegang peranan penting terjadinya aktivitas antitumor sitotoksik temozolomide yang terhitung 5% dari total lesi DNA *adduct* dengan TMZ.²⁹

Agen kemoterapi ini secara cepat dan lengkap diabsorbsi setelah pemberian per oral serta mencapai konsentrasi puncak plasma dalam waktu satu jam. Keadaan ini berkaitan dengan sifat alami temozolomide yang lipofilik dan stabil dalam asam. Makanan di dalam lambung akan menurunkan tingkat absorpsi dan

memperpanjang waktu absorpsi TMZ. Pemberian obat ini setelah makanan tinggi lemak akan menurunkan rerata konsentrasi puncak plasma menjadi 32% dan meningkatkan waktu mencapai konsentrasi maksimum (*Tmax*) sampai dua kali lipat.²⁸

Analisis yang dilakukan pada agen TMZ secara konsisten menunjukkan bioavailabilitas obat ini tetap 100% setelah administrasi per oral dan tidak didapatkan akumulasi obat pada hari kelima setelah dosis pemberian 5 hari. Waktu untuk mencapai konsentrasi maksimal dalam plasma (*Tmax*) kurang lebih satu jam. Eliminasi waktu paruh (*t1/2*) sekitar 1,6-1,8 jam (tabel 2). Setelah diabsorpsi per oral, obat ini mengalami tiga proses eliminasi yang melibatkan ekskresi melalui ginjal, baik dalam bentuk obat yang tidak berubah maupun hasil degradasinya. Proses eliminasi yang utama adalah melalui hidrolisis yang tergantung pH untuk menjadi senyawa MTIC dan kemudian terdegradasi menjadi AIC. Eliminasi TMZ tidak bergantung dosis. Profil farmakokinetik TMZ pada pasien dengan gangguan fungsi hepar ringan sampai sedang adalah sama dengan pasien fungsi hepar normal.^{30,31}

Tabel 2. Parameter farmakokinetik temozolomide diberikan dengan dosis sekali sehari selama 5 hari³⁰

	<i>Adult Phase I study : Newlands et al.</i>	<i>Pediatric Phase I study : Estlin et al.</i>	<i>Pediatric Phase I study : Brada et al.</i>
<i>Tmax</i> (h)	0,33-2	0,33-3	0,33-2,5
<i>T1/2</i> (h)	1,6-1,8	1,7	1,6-1,8
<i>Clearance rate</i> (liters/h)	12		
<i>Oral bioavailability</i>	1,09		

Temozolomide memiliki rerata volume distribusi sebesar 0,4l/kg. Agen ini berikatan secara lemah dengan protein plasma. TMZ tidak terakumulasi dalam plasma setelah pemberian beberapa dosis maupun dosis berlanjut selama beberapa minggu. Penetrasi obat ini dalam memasuki sistem saraf pusat telah diteliti pada hewan percobaan dan menunjukkan kadar obat ini dapat mencapai otak dan cairan serebrospinal kurang lebih 30%-40% dari total konsentrasi dalam plasma. Uji farmakokinetik TMZ pertama kali pada manusia untuk menghitung penetrasi TMZ ke cairan serebrospinal dilakukan oleh Ostermann *et al.*³²

Temozolomide diberikan bersamaan dengan radioterapi (*concomitant therapy*) yang dilanjutkan dengan terapi adjuvan pada pasien yang baru pertama kali terdiagnosis GBM, dapat pula digunakan sebagai terapi tunggal pada kasus GBM *recurrent*. Pemberian kemoterapi GBM dapat dilakukan dengan berbagai pertimbangan klinis antara lain usia lebih dari 18 tahun, diagnosis GBM ditegakkan dengan pemeriksaan

histopatologis, memiliki nilai KPS ≥ 70 , data hematologis yang adekuat (neutrofil $\geq 1500/\text{mm}^3$, trombosit $\geq 100.00/\text{mm}^3$), fungsi ginjal yang baik (kreatinin serum $\leq 1,5$ kali batas atas normal), fungsi hepar adekuat (bilirubin serum total $\leq 1,5$ kali batas atas normal). Pasien yang mendapat terapi steroid dilakukan stabilisasi dosis atau penurunan dosis terlebih dahulu dalam waktu 7-14 hari sebelum pemberian kemoterapi temozolomide.⁷

Agen TMZ diberikan per oral satu kali sehari dapat ditelan bersama air. Sebaiknya pemberian obat ini tidak saat lambung kosong. Dosis TMZ dihitung berdasarkan *body surface area* (BSA) individu. Dosis yang direkomendasikan pada terapi *concomitant* adalah 75 mg/m²/hari diberikan selama tujuh hari dalam seminggu, dimulai saat hari pertama radioterapi sampai hari terakhir, tetapi tidak lebih dari 49 hari. Setelah henti terapi selama empat minggu, dilanjutkan terapi adjuvan dengan pemberian TMZ dosis awal 150 mg/m²/hari diberikan selama lima hari, dan diulang tiap 28 hari sekali sampai dengan enam siklus pemberian. Permulaan siklus kedua dari dosis 200 mg/m²/hari dengan mempertimbangkan efek toksisitas hematologis. Pemeriksaan darah lengkap dilakukan pada hari ke-22 setelah pemberian dosis pertama TMZ dan diulang pada hari ke-28.³¹

Pemberian temozolomide yang direkomendasikan pada kasus GBM *recurrent* dimulai dari dosis 150mg/m²/hari apabila sebelumnya sudah pernah mendapatkan kemoterapi, atau 200 mg/m²/hari apabila sebelumnya belum pernah mendapat kemoterapi. Temozolomide dapat diberikan selama lima hari dan diulang setiap 28 hari. Dosis temozolomide dapat ditingkatkan, dipertahankan, atau diturunkan mulai pemberian pada siklus kedua dengan mempertimbangkan hasil evaluasi laboratorium nilai neutrofil dan trombosit. Dosis temozolomide pada siklus kedua atau berikutnya dapat ditingkatkan menjadi 200 mg/m²/hari apabila angka neutrofil $>1500/\text{mm}^3$ dan angka trombosit $>100.000/\text{mm}^3$. Dosis TMZ dapat diturunkan sebesar 50 mg/m²/hari apabila angka neutrofil $<1000/\text{mm}^3$, tetapi dosis tidak boleh kurang dari dosis terendah yang direkomendasikan yaitu 100 mg/m²/hari. Pemberian kemoterapi temozolomide dilakukan sampai dengan 6-10 siklus.²⁸

Efek samping yang paling sering dilaporkan pada pasien yang mendapat kemoterapi TMZ adalah mielosupresi seperti neutropenia dan trombositopenia ringan sampai sedang. Hal ini dihubungkan dengan besarnya dosis yang diberikan. Angka terendah neutropenia dan trombositopenia terjadi pada hari ke-21 sampai hari ke-28 setelah pemberian dosis pertama TMZ. Untuk mengendalikan dan menurunkan dosis dilakukan pada jadwal siklus pemberian selanjutnya.^{30,28}

Peranan status metilasi MGMT terhadap keberhasilan kemoterapi TMZ

Protein MGMT berperan penting dalam mekanisme resistensi TMZ dengan memindahkan grup alkil dari posisi O6-guanin yang berefek perbaikan lesi sitotoksik TMZ. Efek sitotoksik temozolomide bergantung pada keseimbangan antara tingkat pembentukan O6-metilguanin dengan tingkat perbaikannya. Konsentrasi TMZ intraseluler dan tingkat aktivitas MGMT berada pada posisi yang seimbang sehingga sel tumor yang memiliki tingkat aktivitas MGMT yang rendah akan makin sensitif terhadap TMZ.^{31,32}

Studi pendahuluan menunjukkan bahwa metilasi promotor MGMT berhubungan dengan peredaman gen epigenetik, penurunan ekspresi gen MGMT, dan kehilangan fungsi perbaikan DNA. Tumor dengan status promotor MGMT termetilasi lebih sensitif terhadap zat pengalkil, sedangkan tumor dengan status promotor MGMT tidak termetilasi artinya MGMT dalam jumlah yang tinggi lebih resisten terhadap zat pengalkil. Status promotor MGMT termetilasi berhubungan dengan peningkatan kelangsungan hidup pada pasien *high-grade glioma* yang diterapi dengan TMZ.²⁴

Methylguanine-DNA methyltransferase adalah protein yang pertama kali ditemukan pada bakteri yang memiliki fungsi memperbaiki kerusakan DNA. Aktivitas protein ini secara spesifik adalah menghilangkan grup metil/alkil dari rangkaian guanin posisi O6 serta mengubah guanin tersebut ke dalam bentuk normalnya kembali tanpa menyebabkan kerusakan untaian DNA. Dengan aktivitas MGMT maka protein ini menjadi salah satu faktor penting terhadap resistensi obat dan dapat menjadi target modulasi biokimia terhadap resistensi obat.²⁴

Implikasi status metilasi MGMT

Penelitian yang dilakukan oleh The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 26981-22981- National Cancer Institute of Canada (NCIC) CE.3 menyatakan bahwa dengan penambahan TMZ pada pengobatan standar yaitu radioterapi pada pasien GBM dengan status promotor MGMT termetilasi lebih menguntungkan dibandingkan pada pasien dengan status MGMT tidak termetilasi.³²

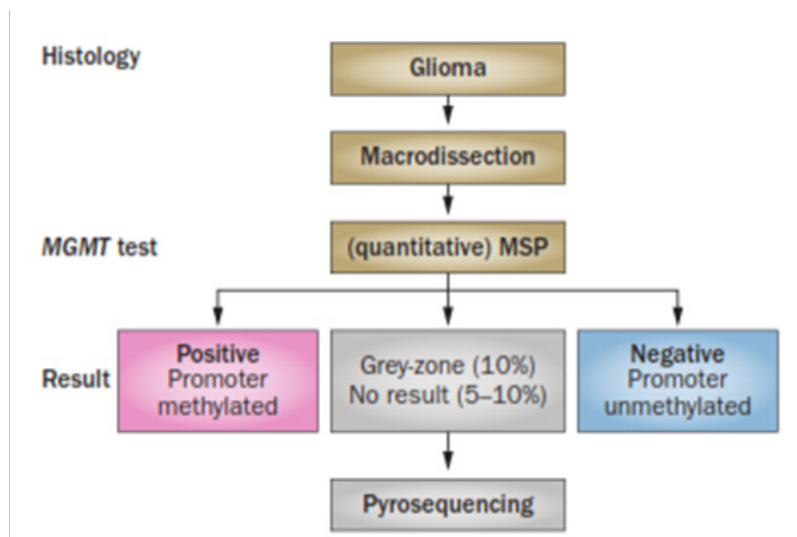
Pada tahun 2012, pengujian-pengujian yang disponsori oleh Neuro-oncology Working Group of the German Cancer Society dan Nordic Clinical Brain Tumour Study Group tidak hanya memberikan bukti kuat bahwa status metilasi MGMT berperan dalam memprediksi respon penanganan TMZ pada glioblastoma usia tua, tetapi juga mendemonstrasikan bagaimana penilaian MGMT dapat membantu pemilihan strategi penanganan yang tepat. Pengujian-pengujian ini

mengindikasikan bahwa monoterapi TMZ setidaknya sama efektifnya dengan radioterapi untuk pasien orang tua dengan glioblastoma dan rerata kelangsungan hidup lebih tinggi pada pasien glioblastoma dengan MGMT termetilasi yang diberikan TMZ daripada grup lainnya.³³

Uji metilasi promotor MGMT terstandardisasi harus bersifat sensitif, spesifik, dapat direproduksi, dan dapat dipakai pada jaringan yang difiksasi dengan formalin dan ditanam dalam parafin. *Methylation Specific PCR* (MSP) telah berkembang menjadi metode diagnostik berbasis DNA yang saat ini paling banyak digunakan untuk menilai metilasi promotor. MSP dapat dilakukan secara reliabel pada spesimen biopsi stereotaktis, sebagai contoh, dari pasien dengan glioma yang tidak dapat direseksi. Selain itu, MSP pada serangkaian spesimen biopsi stereotaktis telah menunjukkan distribusi homogen dari metilasi promotor MGMT pada glioblastoma. Bagaimanapun, MSP tidak dapat mendeteksi pola heterogenitas metilasi, terutama saat dilakukan pada DNA dengan kualitas rendah yang diekstraksi dari jaringan yang difiksasi dan ditanam. Sehingga dibutuhkan pemeriksaan lanjutan berupa *pyrosequencing* (Gambar 1). Nilai *cut-off* untuk membedakan antara glioma MGMT termetilasi dan MGMT tidak termetilasi biasanya ditetapkan sebagai titik terendah kurva distribusi logaritmik dari nilai metilasi kuantitatif yang didapat dari sejumlah besar hasil uji, yang merepresentasikan *cut-off* teknis.³³

Dengan masuknya pengujian metilasi promotor MGMT ke praktik klinis rutin, pengukuran kontrol kualitas eksternal dan internal perlu diperkuat karena baik hasil positif palsu maupun negatif palsu dapat membahayakan pasien.³⁴ Adapun tantangan pada pengujian status metilasi MGMT meliputi teknis terkait pengujian metilasi, termasuk permasalahan zona kelabu dan lebih penting lagi tidak adanya alternatif berbasis bukti untuk perawatan standar terkini pada glioblastoma. Kombinasi radioterapi dikombinasikan dengan TMZ, walaupun dengan bukti klinik memiliki OS dan PFS yang rendah tetap menjadi pilihan terapi mengingat tingkat keamanan dan tolerabilitas temozolomide.²²

Efek samping temozolomide dapat dibagi menjadi dua, yaitu hematologik dan nonhematologik. Sebuah studi di Korea menunjukkan efek samping hematologik yang paling sering terjadi adalah trombositopeni, anemia, dan peningkatan *aminotransferase* (AST)/ *alanine aminotransferase* (ALT).³⁵ Efek samping nonhematologik yang sering terjadi, antara lain mual, muntah, anoreksia, dan nyeri kepala. Pada beberapa kasus, temozolomide dapat menyebabkan anemia aplastik, myelosupresi serta kematian akibat gagal hati.³⁶ Gangguan gastrointestinal akibat pemakaian temozolomide dapat diatasi dengan pemberian kombinasi, baik secara kombinasi maupun terpisah, obat antagonis reseptor 5-HT₃ (ondansetron) dan



Gambar 1. Alur pemeriksaan metilasi MGMT.³³

antagonis reseptor dopamin (metoklopramid). Apabila terjadi toksisitas hematologik, dapat dipertimbangkan penundaan atau penghentian terapi temozolomide.³⁵

RINGKASAN

Glioblastoma multiforme adalah tumor otak astrocitoma yang menyebabkan angka kematian paling tinggi terkait kanker yang insidensinya semakin bertambah setiap tahunnya. Standar terapi pada GBM, antara lain dengan reseksi tumor dilanjutkan radioterapi dan kemoterapi. Terdapat peningkatan kelangsungan hidup keseluruhan (*overall survival*) maupun kelangsungan hidup tanpa perkembangan penyakit (*progression free survival*) pada pasien GBM yang mendapatkan kemoterapi adjuvan temozolomide. Temozolomide adalah salah satu zat pengalkil yang dapat menembus sawar darah otak dan memiliki aktivitas terapi yang tinggi pada glioma ganas. Namun, selain memiliki efek terapeutik yang baik, GBM sendiri memiliki mekanisme resistensi terhadap agen ini melalui aktivitas protein *O-6 methylguanine-DNA methyltransferase* (MGMT). MGMT adalah protein yang berfungsi untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi pada DNA. Pada pasien GBM, status metilasi promotor gen ini memiliki peranan dalam menentukan responsivitas sel tumor pasien terhadap kemoterapi TMZ yang bekerja sebagai *alkylating agent*. Penilaian status metilasi gen promotor MGMT pada GBM dapat menjadi salah satu tes molekuler yang direkomendasikan pada praktik klinis rutin terutama dalam bidang neuroonkologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Hess KR, Broglio KR, Bondy ML. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977–2000. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2004;101(10):2293-2299.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology*. 2013;15(suppl_2):ii1-ii56.
- Armstrong TS, Wefel JS, Wang M, Gilbert MR, Won M, Bottomley A, et al. Net clinical benefit analysis of radiation therapy oncology group 0525: a phase III trial comparing conventional adjuvant temozolomide with dose-intensive temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(32):4076–4084.
- Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO molecular medicine*. 2014;6(11):1359-1370.
- Ahmed R, Oborski MJ, Hwang M, Lieberman FS, Mountz JM. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Management and Research*. 2014;6:149-170.
- Weller M. Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma. *Swiss Medical Weekly*. 2011;141:w13210.
- Hottinger AF, Stupp R, Homicsko K. Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme. *Chinese Journal of Cancer*. 2014;33(1):32-39.
- Arvold ND, Reardon DA. Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. *Clinical Interventions in Aging*. 2014;9:357–367.
- Bobola MS, Alnoor M, Chen JY, Kolstoe DD, Silbergeld DL, Rostomily RC, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity is associated with response to alkylating agent therapy and with MGMT promoter methylation in glioblastoma and anaplastic glioma. *BBA clinical*. 2015;3:1-10.
- Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LAG, Ehemann C, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(9):714–736.
- Porter A. A dead end: A review of glioblastoma multiforme. *Eukaryon*. 2012;8:64-8.
- Goldlust SA, Turner GM, Goren JF, Gruber ML. Glioblastoma multiforme: multidisciplinary care and advances in therapy. *Hospital Physician*. 2008;1:9-23.
- Zhang X, Zhang WE, Cao WD, Cheng G, Zhang YQ. Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and

- current treatment strategy. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2012;3(1):9-14.
14. Sanghera P, Rampling R, Haylock B, Jefferies S, McBain C, Rees JH, et al. The concepts, diagnosis and management of early imaging changes after therapy for glioblastomas. *Clinical Oncology*. 2012;24(3):216-227.
 15. Murakami R, Hirai T, Sugahara T, Fukuoka H, Toya R, Nishimura S, et al. Grading astrocytic tumors by using apparent diffusion coefficient parameters: superiority of a one-versus two-parameter pilot method. *Radiology*. 2009;251(3):838-845.
 16. Kao HW, Chiang SW, Chung HW, Tsai FY, Chen CY. Advanced MR imaging of gliomas: an update. *BioMed Research International*. 2013;2013.
 17. Yu TG, Feng Y, Feng XY, Dai JZ, Qian HJ, Huang Z. Prognostic factor from MR spectroscopy in rat with astrocytic tumour during radiation therapy. *The British journal of radiology*. 2015;88(1045):20140418.
 18. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2019;18(8):1061–1083.
 19. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2006;2(9):494-503.
 20. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development*. 2001;15(11):1311-1333.
 21. Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicologic Pathology*. 2000;28(1):164-170.
 22. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987-996.
 23. Chang L, Su J, Jia X, Ren H. Treating malignant glioma in Chinese patients: update on temozolomide. *OncoTargets and Therapy*. 2014;7:235–244.
 24. Wang Q, Wei L, Shirley L, Jason SC, Olli AJ, Erika K, et al. Mechanisms of Chemoresistance in Malignant Glioma. 2014;27(3):380–392.
 25. Wang K, Wang YY, Ma J, Wang JF, Li SW, Jiang T, et al. Prognostic value of MGMT promoter methylation and TP53 mutation in glioblastomas depends on IDH1 mutation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;15(24):10893-10898.
 26. Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Research*. 2009;29(12):5171-5184.
 27. Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, Chakravarti A, Gilbert MR, Barger GR, et al. Radiation plus procarbazine, CCNU, and vincristine in low-grade glioma. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(14):1344-1355.
 28. Darkes MJM, GL Plosker, B Jarvis. Temozolomide: a review of its use in the treatment of malignant gliomas. *American Journal Cancer*. 2002;1(1):55–80.
 29. Koukourakis GV, Kouloulis V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, et al. Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceutical considerations and efficacy; a review article. *Molecules*. 2009;14(4):1561-1577.
 30. Newlands ES, GR Blackledge, JA Slack, GJ Rustin, DB Smith, NS Stuart, et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045; M&B 39831; NSC 362856). *British Journal of Cancer*. 1992;65(2):287–291.
 31. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(7):2585-2597.
 32. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):997-1003.
 33. Wick W, Weller M, Van Den Bent M, Sanson M, Weiler M, Von Deimling A, et al. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*. 2014;10(7):372-385.
 34. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PloS One*. 2012;7(3):e33449.
 35. Bae SH, Park MJ, Lee MM, Kim TM, Lee SH, Cho SY, et al. Toxicity profile of temozolomide in the treatment of 300 malignant glioma patients in Korea. *Journal of Korean medical science*. 2014;29(7):980.
 36. Dixit S, Baker L, Walmsley V, Hingorani M. Temozolomide-related idiosyncratic and other uncommon toxicities: a systematic review. *Anti-cancer drugs*. 2012;23(10):1099-1106.