

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Утрата экспрессии CD20 при фолликулярной лимфоме после программной противоопухолевой терапии, включающей ритуксимаб: данные литературы и собственное наблюдение

О.М. Володина, Н.А. Купрышина, Н.А. Фалалеева, В.А. Доронин, А.В. Моженкова, М.А. Френкель, Е.Н. Сорокин, Н.В. Кокосадзе, Н.Н. Тупицын, Г.С. Тумян, Е.А. Османов

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

Loss of CD20 Expression in Follicular Lymphoma after Program Anti-Tumor Therapy Including Rituximab: Literature Data and Case Report

OM Volodina, NA Kupryshina, NA Falaleeva, VA Doronin, AV Mozhenkova, MA Frenkel', EN Sorokin, NV Kokosadze, NN Tupitsyn, GS Tumyan, EA Osmanov

NN Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

РЕФЕРАТ

Это первое в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ описание клинического наблюдения фолликулярной лимфомы с утратой экспрессии антигена CD20 в процессе противоопухолевого лечения, включавшего ритуксимаб. Обсуждается тактика дальнейшего ведения подобных пациентов, а также влияние на прогноз приобретенного в процессе иммунохимиотерапии CD20-негативного статуса опухолевыми клетками фолликулярной лимфомы.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, CD20-негативный, ритуксимаб.

Получено: 18 ноября 2016 г.

Принято в печать: 2 февраля 2017 г.

Для переписки: Ольга Михайловна Володина, аспирант, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(499)324-28-54; e-mail: volodi.olga2012@yandex.ru

Для цитирования: Володина О.М., Купрышина Н.А., Фалалеева Н.А. и др. Утрата экспрессии CD20 при фолликулярной лимфоме после программной противоопухолевой терапии, включающей ритуксимаб: данные литературы и собственное наблюдение. Клиническая онкогематология. 2017;10(2):176–81.

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-176-181

ABSTRACT

It is the first description of a case of follicular lymphoma with a loss of CD20 antigen expression during the anti-tumor treatment including rituximab in the NN Blokhin Russian Cancer Research Center. The article discusses the tactics of further management of such patients and the effect of the CD20-negative status of follicular lymphoma tumor cells acquired during immunochemotherapy.

Keywords: follicular lymphoma, CD20-negative, rituximab.

Received: November 18, 2016

Accepted: February 2, 2017

For correspondence: Ol'ga Mikhailovna Volodina, post-graduate student, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel: +7(499)324-28-54; e-mail: volodi.olga2012@yandex.ru.

For citation: Volodina OM, Kupryshina NA, Falaleeva NA, et al. Loss of CD20 Expression in Follicular Lymphoma after Program Anti-Tumor Therapy Including Rituximab: Literature Data and Case Report. Clinical oncohematology. 2017;10(2):176–81 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-176-181

ВВЕДЕНИЕ

Ритуксимаб относится к химерным анти-CD20-моноклональным антителам [1]. Антиген CD20 — это трансмембранный белок, который экспрессируется

на поверхности только зрелых В-клеток, как опухолевых, так и нормальных. CD20 является привлекательной мишенью для иммунотерапии. Антиген не экспрессируется на стволовых клетках костного мозга и не циркулирует в плазме [2]. Механизм его

действия заключается в запуске антителозависимой клеточной цитотоксичности, комплемент-зависимой цитотоксичности, что сопровождается замедлением опухолевого роста, нарушением клеточного цикла и индукцией апоптоза вследствие прямого связывания антител с мембранным антигеном CD20 [1]. Кроме того, при исследованиях *in vitro* показано, что ритуксимаб делает опухолевые клетки более чувствительными к воздействию циклофосфида, винкристина, доксорубина и преднизолона [3].

В начале 2000-х годов проводились крупные рандомизированные исследования, в которых показано преимущество добавления ритуксимаба к стандартной химиотерапии у первичных больных фолликулярной лимфомой. Это преимущество сохранялось и при оценке отдаленных результатов лечения независимо от метода химиотерапии. При этом добавление ритуксимаба позволило увеличить 4-летнюю общую выживаемость больных фолликулярной лимфомой на 10 % [4–7].

Однако в части случаев отмечается отсутствие реакции опухоли на ритуксимаб. Показано, что вариабельность противоопухолевого ответа на ритуксимаб зависит от нескольких факторов: индивидуального полиморфизма гена, кодирующего рецептор Fc gammaRIIIa-158V/F [8], уровня экспрессии антигена CD20 [9] и распространенности опухолевого процесса (опухолевой нагрузки) [10].

Прямым показанием к назначению ритуксимаба является экспрессия антигена CD20 на мембране злокачественных клеток фолликулярной лимфомы. Вместе с тем в литературе приводятся описания случаев утраты антигена CD20 на мембране опухолевых клеток в процессе терапии ритуксимабом как при фолликулярной лимфоме, так и при ряде других вариантов неходжкинских лимфом [11–18].

В настоящей работе представлено описание подобного клинического наблюдения.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Мужчина, 44 года. В начале 2007 г. пациент отметил небольшое увеличение паховых лимфатических узлов. В 2008 г. увеличились шейные лимфатические узлы. На базе НИИ фтизиопульмонологии 25.02.2009 выполнена биопсия правого шейного лимфатического узла. При гистологическом исследовании материала биопсии картина более всего соответствует фолликулярной гиперплазии, заподозрена вирусная этиология лимфаденопатии. В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием антител к CD3, CD10, CD20, CD23, BCL-2, IgD, Ki-67. Опухолевые клетки фолликулоподобных структур экспрессировали CD20, CD10, BCL-2. Индекс пролиферативной активности Ki-67 — 20–40 % в пределах фолликулоподобных структур. В основе фолликулоподобных структур определялась органическая сеть фолликулярных дендритных клеток CD23+. Зона мантии фолликулоподобных структур отсутствовала. Таким образом, при иммуногистохимическом исследовании была установлена фолликулярная лимфома II цитологического типа с нодулярным характером роста опухоли.

Дальнейшее наблюдение и лечение осуществлялись в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ. По данным УЗИ (19.03.2009) выявлялось увеличение периферических лимфатических узлов по обе стороны диафрагмы до 6,5 см в диаметре, внутрибрюшные лимфатические узлы образовывали конгломерат размером 12 × 5 см, забрюшинные — парааортально на уровне L_{II}–L_V формировали опухолевый конгломерат 10 × 8 см. Размеры селезенки — 6 × 14 см, печень выступала из-под края реберной дуги на 2 см. В миелограмме (20.03.2009): миелокариоциты — 188 × 10⁹/л, лимфоциты — 43,4 %, лимфоидные клетки с атипичным строением ядра — 11 %. Все клетки гранулоцитарного ростка составили 29 %, эритроидного — 11,6 %. При гистологическом исследовании материала трепанобиопсии подвздошной кости (19.03.2009) определялся нормоклеточный костный мозг, представленный клетками всех ростков кроветворения, обнаруживались паратрабекулярно расположенные очаговые инфильтраты из мелких лимфоидных клеток. Гемограмма без особенностей, уровень лактатдегидрогеназы 314 ЕД/л. Установлен клинический диагноз: фолликулярная лимфома, II цитологический тип с поражением периферических по обе стороны диафрагмы медиастинальных, внутрибрюшных, забрюшинных лимфатических узлов, печени, селезенки, костного мозга, стадия IVA. FLIPI — промежуточный риск.

С апреля по сентябрь 2009 г. больному проведено 8 циклов R-CHOP-21 (ритуксимаб 375 мг/м², доксорубин 50 мг/м², циклофосфамид 750 мг/м², винкристин 1,4 мг/м², преднизолон 100 мг/сут). В октябре 2009 г. после завершения программы лечения констатирована полная регрессия внекостномозговых опухолевых поражений. Однако в миелограмме (29.10.2009) количество миелокариоцитов составило 53 × 10⁹/л, лимфоцитов — 23,6 %. Гранулоцитарный росток сужен до 28,4 %. Красный росток расширен до 39,4 %. В материале трепанобиопсии подвздошной кости (29.10.2009) — частицы деформированных костных балок с очажками кроветворной ткани, представленной элементами всех трех ростков гемопоэза. Определялись очажки резко деформированных клеток, скорее, эритроидного ряда.

В ноябре 2009 г. у больного отмечено увеличение паховых лимфатических узлов и появление множественных мягкотканых образований по внутренней поверхности обоих бедер до 2,4 см в диаметре. Прогрессирование лимфомы подтверждено морфологическим исследованием мягкотканного образования правого бедра (биопсия 05.11.2009). В биоптате имела место картина фолликулярной лимфомы I цитологического типа. В связи с отсутствием необходимости в незамедлительном начале лечения (низкая опухолевая нагрузка) больному рекомендовано наблюдение. В октябре 2011 г. отмечено прогрессирование опухоли с поражением шейных лимфатических узлов и мягких тканей околоушной области слева. С октября 2011 г. по апрель 2012 г. больному проведено 6 циклов иммунохимиотерапии в режиме R-V (ритуксимаб 375 мг/м² в день 0; бендамустин 90 мг/м² в 1-й и 2-й дни). Достигнута частичная ремиссия. Далее, с июня 2012 г. по февраль 2015 г. проводилась поддерживающая терапия ритуксимабом (375 мг/м² каждые 3 мес.).

Таблица 1. Панель моноклональных антител, использованных для иммунофенотипирования клеток крови больного

Проба №	Флюорохром							
	FITC	PE	PerCP-cy5	Pe-cy7	APC	APC-H7	V450	V500
Антиген								
1	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	CD20	CD45
2	CD31	CD35	CD11c	CD19	sIgM	CD81	CD20	CD45
3	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185	CD49d	CD20	CD45
4	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27		CD20	CD45

В сентябре 2015 г. больной вновь отметил увеличение шейных лимфатических узлов, снижение массы тела на 10 кг в течение 2 мес., подъемы температуры тела до 37,5 °С. Выполнена компьютерная томография грудной клетки и брюшной полости (21.09.2015). Помимо генерализованной периферической лимфаденопатии (шейные лимфатические узлы до 4,2 см, надключичные — до 2,8 см, подключичные — до 4,7 см, подмышечные — до 4,7 см, паховые — до 3,0 см) было установлено поражение лимфатических узлов средостения и корней легких, внутрибрюшных (множественные до 5 × 2 см, сливающиеся в когломераты), забрюшинных лимфатических узлов (конгломерат 10,0 × 4,5 см). Кроме того, выявлено поражение легочной ткани (в нижних долях очагово-инфильтративного характера), а также левой околоушной слюнной железы (5,3 × 3,5 см), увеличение печени и селезенки.

В миелограмме по отпечаткам трепанобиоптата костного мозга (10.11.2015) количество клеток лимфоидного ряда увеличено до 38 %. Они представлены преимущественно мелкими формами (небольшого размера) с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. В некоторых клетках ядро занимает всю цитоплазму. Ядра округлые, в части клеток — с расщелиной (центроциты). Хроматин плотный, глыбчатый. Среди лимфоидных элементов выделяется небольшая пропорция клеток (около 10 %) более крупного размера с округлыми ядрами и нежно-сетчатым хроматином, нуклеолы не видны.

При гистологическом исследовании материала трепанобиопсии подвздошной кости (10.11.2015) костный мозг гиперклеточный за счет паратрабекулярных пролифератов преимущественно из мелких лимфоидных клеток — субстрат фолликулярной лимфомы.

Иммунофенотипирование периферической крови выполнено на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto II с использованием многоцветного окрашивания согласно протоколу EuroFlow 2012 г. (табл. 1).

В табл. 2 представлены маркеры, используемые для дифференциальной диагностики злокачественных В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний с фенотипом периферических органов иммунной системы.

Следует отметить, что на основе подхода EuroFlow удается детально охарактеризовать В-клетки в связи с одновременным использованием трех «каркасных» маркеров (CD19, CD20 и CD45) для точного гейтирования популяции В-клеток. Остальные антигены уточняют стадию дифференцировки, активацию клеток и наличие атипичных или так называемых aberrantных признаков, не присущих нормальным аналогам В-клеток.

Таблица 2. Результаты иммунофенотипирования клеток периферической крови больного

Маркер	Число антигенпозитивных лимфоидных клеток (CD45+), %	
	В-клеточные антигены	
CD19	4,0	
В пределах В-клеток (CD19+)		
CD20	2,9	
CD23	3,0	
CD10	87,0	
CD200	87,6	
CD79b	86,6	
CD22	3,4	
CD43	2,9	
CD81	95,5	
CD31	0,6	
CD305	3,7	
CD11c	0,5	
sIgM	99,8	
CD103	0,1	
CD95	47,8	
CD185	99,2	
CD49d	0,7	
CD62L	0,1	
CD39	29,4	
HLA-DR	97,2	
CD27	16,6	

Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови (07.12.2015): В-клетки, определяемые по экспрессии антигена CD19, составляли около 4 % (рис. 1). На поверхности опухолевых клеток определялись антиген CD79b (86,6 %) и поверхностный иммуноглобулин (sIgM), антиген клеток фолликулярных центров CD10 (87 %), молекулы CD200 (87,6 %), CD81 (95,5 %), CD185 (99,2 %). Отсутствовали экспрессия CD22 (3,4 %) и активационный антиген CD23 (3 %). Опухолевые клетки оказались отрицательными по антигену CD20 (2,9 %).

15.12.2015 выполнена торакоскопическая резекция экстрамедулярной опухоли в верхней доле правого легкого. При морфоиммуногистохимическом исследовании с использованием расширенной панели антител CD20, CD3, CD23, CD79a, Ki-67, CD10, BCL-2, BCL-6, PAX5 выявлено, что опухолевые клетки экспрессируют CD79a, PAX5, CD10, BCL-2, BCL-6 (часть клеток). Ki-67 был положительным в ядрах 3–5 % опухолевых клеток. Экспрессия CD23 не обнаружена. Клетки опухоли не экспрессировали CD20. Результаты

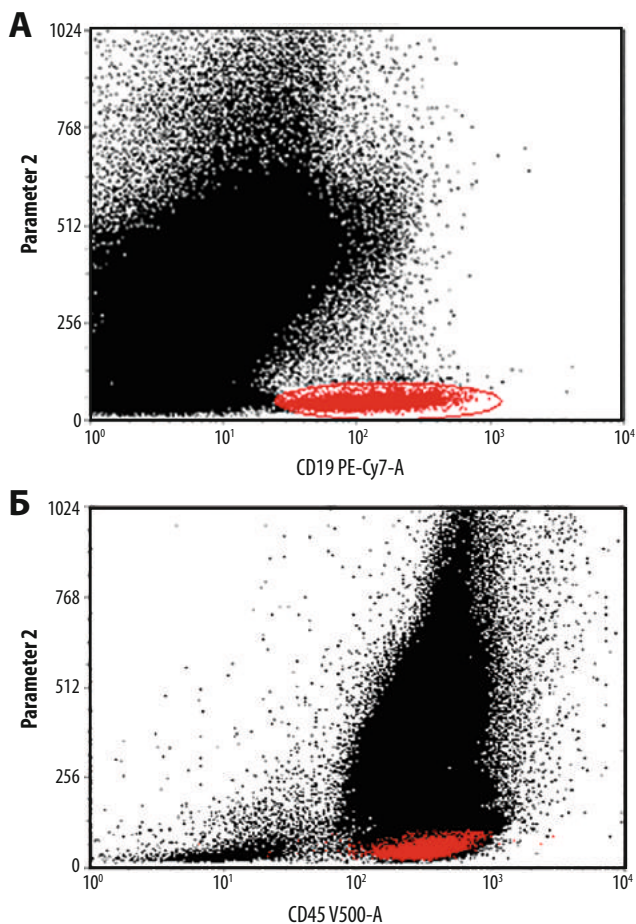


Рис. 1. Экспрессия антигенов CD19 и CD45. По оси x красным цветом выделены CD19-позитивные В-клетки (А), положительные по экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45 (Б)

Fig. 1. Expression of CD19 and CD45. CD19-positive B-cells (A) are marked with red along the X axis. They are positive in expression of the leukocyte common antigen CD45 (B)

морфологического и иммуногистохимического исследований представлены на рис. 2–7.

Таким образом, у пациента подтверждено прогрессирование фолликулярной лимфомы I–II цитологического типа с генерализованным нодальным и экстранодальным опухолевым процессом. Активность опухолевого процесса подтверждалась появлением симптомов интоксикации. Иммуногистохимически опухолевые клетки характеризовались утратой антигена CD20. Далее предпринимались попытки применения различных режимов химиотерапии с кратковременным противоопухолевым эффектом после каждого цикла. Заболевание характеризовалось непрерывно рецидивирующим течением. Последующее лечение леналидамидом оказалось высокоэффективным с регрессией опухоли более чем на 80 %. Больной оставался под наблюдением.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном клиническом наблюдении демонстрируется утрата экспрессии опухолевыми В-клетками фолликулярной лимфомы антигена CD20 у больного, получавшего противоопухолевое лечение на основе ритуксимаба (анти-CD20-моноклональные

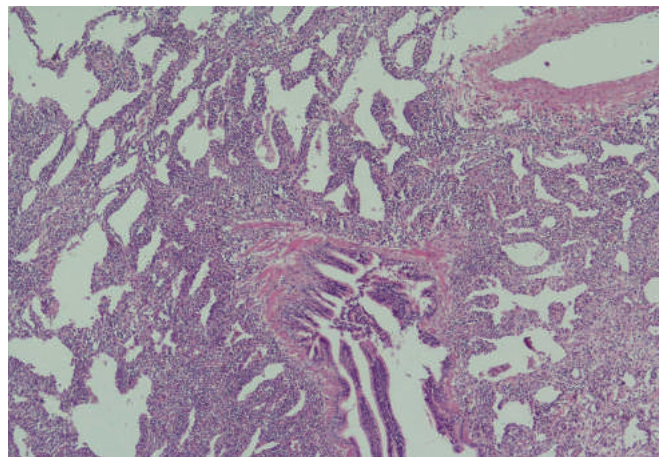


Рис. 2. Гистологический препарат ткани легкого. Паренхима легкого с диффузным интерстициальным инфильтратом из небольших лимфоидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином, ×40

Fig. 2. A histological specimen of lung tissue. Lung parenchyma with diffuse interstitial infiltrate of small lymphoid cells. Hematoxylin and eosin stain, ×40

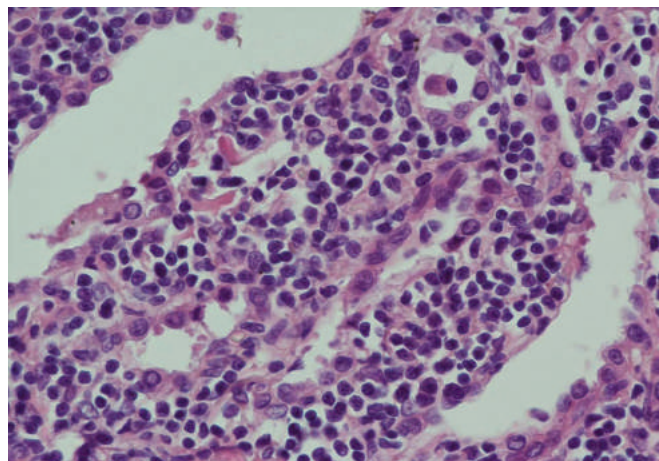


Рис. 3. Гистологический препарат ткани легкого. Диффузный инфильтрат состоит преимущественно из лимфоидных клеток небольшого размера с ядрами неправильной формы (центроцитов). Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 3. A histological specimen of lung tissue. Diffuse infiltrate consists mainly of medium-sized lymphoid cells with irregular shaped nuclei, i.e. centrocytes. Hematoxylin and eosin stain, ×400

антитела). Опухоль на всем протяжении сохраняла строение мелкоклеточной (I–II цитологический тип) фолликулярной лимфомы. В то же время, по данным литературы, утрата антигена CD20 при фолликулярной лимфоме сопровождается клиническими и иммуноморфологическими признаками трансформации в диффузную В-крупноклеточную лимфому.

Частота феномена утраты экспрессии CD20, механизм развития, биологический смысл, а также клиническое значение остаются неизвестными. В литературе имеется несколько небольших исследований по этому вопросу, однако они крайне неоднородны и не позволяют должным образом оценить частоту этого явления [14, 18]. Так, G.A. Kennedy и соавт. [18] проводили повторную биопсию у 10 из 13 пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Потеря

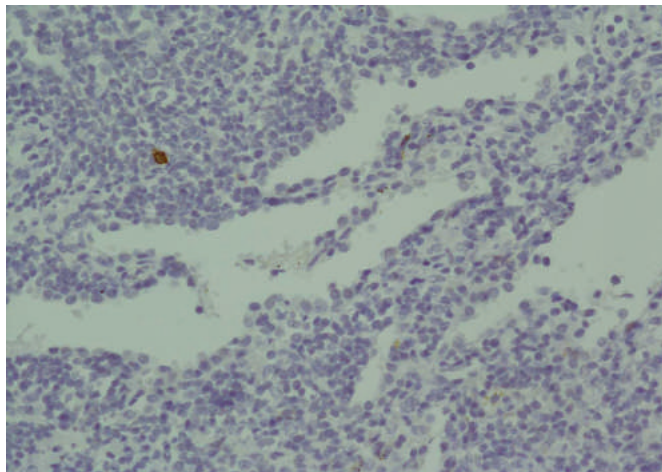


Рис. 4. Гистологический препарат ткани легкого. Лимфоидный инфильтрат содержит лишь единичные CD20-позитивные клетки. Иммуногистохимическое исследование на CD20, $\times 200$

Fig. 4. A histological specimen of lung tissue. Lymphoid infiltrate contains single CD20-positive cells only. Immunohistochemical test for CD20, $\times 200$

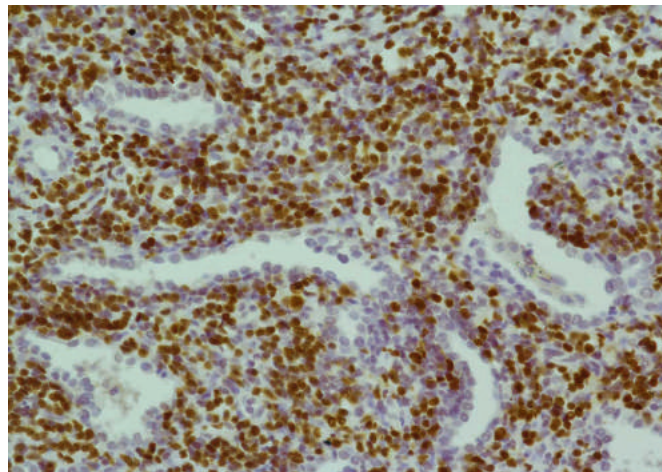


Рис. 5. Гистологический препарат ткани легкого. Большинство клеток лимфоидного инфильтрата являются CD20-негативными В-клетками. Иммуногистохимическое исследование на PAX5, $\times 200$

Fig. 5. A histological specimen of lung tissue. Most cells of the lymphoid infiltrate are CD20-negative B-cells. Immunohistochemical test for PAX5, $\times 200$

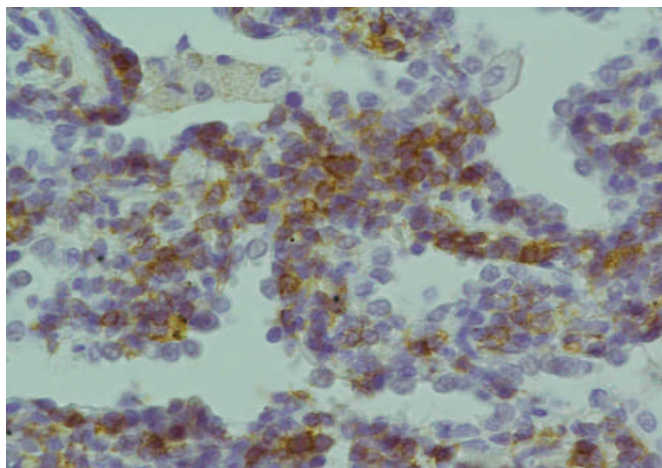


Рис. 6. Гистологический препарат ткани легкого. Большая часть В-клеток инфильтрата экспрессирует CD10. Иммуногистохимическое исследование на CD10, $\times 400$

Fig. 6. A histological specimen of lung tissue. Most B-cells of the infiltrate express CD10. Immunohistochemical test for CD10, $\times 400$

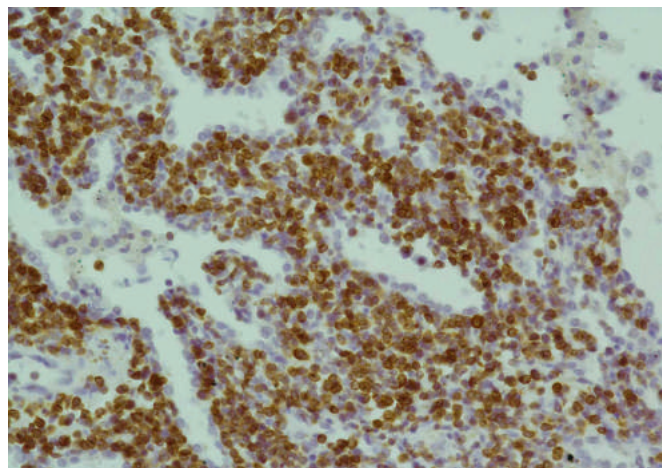


Рис. 7. Гистологический препарат ткани легкого. Большая часть клеток инфильтрата экспрессирует BCL-2. Иммуногистохимическое исследование на BCL-2, $\times 200$

Fig. 7. A histological specimen of lung tissue. Most B-cells of the infiltrate express BCL-2. Immunohistochemical test for BCL-2, $\times 200$

антигена CD20 обнаруживалась у 6 (46 %) больных. J. Hiraga и соавт. [14] выполняли повторную биопсию при рецидивах неходжкинских лимфом у 12 из 36 пациентов. В 5 наблюдениях констатирована потеря экспрессии антигена CD20. При этом у 2 больных фолликулярной лимфомой имели место признаки трансформации опухоли в диффузную В-крупноклеточную лимфому. Все 5 пациентов умерли на фоне прогрессирования лимфомы в сроки от 1 до 11 мес. со времени обнаружения потери экспрессии антигена CD20.

Существует несколько гипотез патогенеза утраты экспрессии антигена CD20 В-клетками CD79a-позитивной лимфомы:

- 1) связывание антигена CD20 с ритуксимабом и длительное (стабильное) сохранение комплекса антиген-моноклональные антитела [12, 13];

- 2) исчезновение пула CD20-позитивных опухолевых клеток в результате лечения ритуксимабом. В итоге могут появиться преимущества для опухолевой прогрессии у претерпевшего дополнительные мутации CD20-негативного клона. Потеря экспрессии CD20 при этом является результатом отсутствия транскрипции или проникновения в клетку антигена [15].

Возможное объяснение этого явления продемонстрировал J. Hiraga и соавт. путем использования клонов В-клеток, полученных от больных с рецидивами В-клеточных лимфом, утративших экспрессию антигена CD20. Авторы показали, что при обработке этих клеток *in vitro* азациитидином экспрессия генов восстанавливалась, что приводило к повышению уровня мРНК CD20 [14].

Все описанные случаи демонстрируют важность проведения повторных биопсий при рецидивах или

прогрессировании В-клеточных лимфом на фоне иммунохимиотерапии. Утрата опухолевыми В-клетками CD20-антигена определяет плохой прогноз и короткий срок жизни больных.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Е.А. Османов, главный редактор, Н.Н. Тупицын, заместитель главного редактора, М.А. Френкель, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовали в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: О.М. Володина, Н.А. Фалалеева.

Сбор и обработка данных: О.М. Володина, Н.А. Фалалеева.

Предоставление материалов исследования: Н.А. Купрышина, М.А. Френкель, Н.В. Кокосадзе, А.В. Моженкова.

Анализ и интерпретация данных: Н.В. Кокосадзе, Н.А. Купрышина, М.А. Френкель, О.М. Володина, Н.А. Фалалеева, Е.Н. Сорокин, В.А. Доронин, Г.С. Тумян.

Подготовка рукописи: О.М. Володина, Н.А. Фалалеева.

Окончательное одобрение рукописи: В.А. Доронин, Г.С. Тумян, Н.Н. Тупицын, Е.А. Османов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Singh V, Gupta D, Almasan A. Development of Novel Anti-Cd20 Monoclonal Antibodies and Modulation in Cd20 Levels on Cell Surface: Looking to Improve Immunotherapy Response. *J Cancer Sci Ther.* 2015;7(11):347–58. doi: 10.4172/1948-5956.1000373.
2. Alduaij W, Illidge TM. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood.* 2011;117(11):2993–3001. doi: 10.1182/blood-2010-07-298356.
3. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with

good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MINT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):379–91. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70664-7.

4. Salles G, Mounier N, de Guibert S, et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood.* 2008;112(13):4824–31. doi: 10.1182/blood-2008-04-153189.

5. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood.* 2005;106(12):3725–32. doi: 10.1182/blood-2005-01-0016.

6. Herold M, Haas A, Srock S, et al. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol.* 2007;25(15):1986–92. doi: 10.1200/JCO.2006.06.4618.

7. Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(28):4579–86. doi: 10.1200/JCO.2007.13.5376.

8. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma gene. *Blood.* 2002;99(3):754–8. doi: 10.1182/blood.V99.3.754.

9. Van Meerten T, Van Rijn RS, Hol S, et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on D20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):4027–35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0066.

10. Dayde D, Ternant D, Ohresser M, et al. Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood.* 2009;113(16):3765–72. doi: 10.1182/blood-2008-08-175125.

11. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7359–68. doi: 10.1038/sj.onc.1206939.

12. Ferreri AJ, Dognini GP, Verona C, et al. Re-occurrence of the CD20 molecule expression subsequent to CD20-negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2007;92(1):e1–2. doi: 10.3324/haematol.10255.

13. Clarke LE, Bayerl MG, Ehmann WC, Helm KF. Cutaneous B-cell lymphoma with loss of CD20 immunoreactivity after rituximab therapy. *J Cutan Pathol.* 2003;30(7):459–62. doi: 10.1034/j.1600-0560.2003.00078.x.

14. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood.* 2009;113(20):4885–93. doi: 10.1182/blood-2008-08-175208.

15. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res.* 1999;5(3):611–5.

16. Alvaro-Naranjo T, Jaen-Martinez J, Guma-Padro J, et al. CD20-negative DLBCL transformation after rituximab treatment in follicular lymphoma: a new case report and review of the literature. *Ann Hematol.* 2003;82(9):585–8. doi: 10.1007/s00277-003-0694-1.

17. Matsuda I, Hirota S. Bone marrow infiltration of CD20-negative follicular lymphoma after rituximab therapy: a histological mimicker of hematogones and B-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):9737–41.

18. Kennedy GA, Tey SK, Cobcroft R, et al. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br J Haematol.* 2002;119(2):412–6. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03843.x.