

Yumuşak Doku Tümörlerinde İmmunositokimyanın Ayırıcı Tanıdaki Rolü

Immunocytochemistry in Differential Diagnosis of Soft Tissue Tumors

Dr.Fügen VARDAR AKER, Dr.Önder PEKER, Dr.Ümit İNCE

ÖZET: Yumuşak doku lezyonlarının ayırıcı tanısında immunositokimya (İSK)'nin kullanılabilirliği 37 ince iğne aspirasyon biopsisi (İİAB)'nde araştırıldı. Histoloji ile karşılaştırıldığında 1 olgu yanlış pozitif ve 2 olgu yanlış negatifti. 21 olguda sadece sitolojik parametreler ile spesifik tanı verildi. 14 olguda ise sitolojik parametreler ile spesifik tanı konulamadı ve İSK uygulandı. Retrospektif olarak seçilen preparatlarda İSK uygulamadan önce "soldurma" yöntemi uygulandı. İSK uygulandıktan sonra spesifik tanı verilen olguların sayısı 33'e yükseldi.

Sonuç olarak, İSK yumuşak doku lezyonlarının antijenik profilini ortaya koymakta arşiv preparatlarında başarıyla uygulanabilir bir tekniktir.

Anahtar Kelimeler: Yumuşak doku tümörleri, İmmunositokimya, İnce iğne aspirasyon biopsisi

SUMMARY: The use of immunocytochemistry (ICC) in the differential diagnosis of soft tissue tumors was investigated in 37 fine needle aspiration biopsies. When compared with histology, one of the cytological diagnosis was false-positive and two cases were false-negative. Twenty-one cases were given specific diagnoses by only cytologic parameters. In fourteen cases, a specific diagnosis could not be made by cytology alone and ICC was applied. Retrospectively selected slides were destained before applying the immunostain. After ICC, the number of specifically diagnosed cases increased to 33. In conclusion, ICC technique may be applied successfully to routinely processed archival cytologic smears to determine the antigenic profile of soft tissue tumors.

Key Words: Soft tissue neoplasm, Immunocytochemistry, Fine needle aspiration biopsy

İndiferansiye malign neoplazilerin ayırıcı tanısında olduğu gibi yumuşak doku tümörlerinde

YAZIŞMA ADRESİ: Dr.Fügen VARDAR AKER
Haydarpaşa Numune Hastanesi,
Patoloji Bölümü, İSTANBUL

Haydarpaşa Numune Hastanesi,
Patoloji Bölümü,
İSTANBUL

(YDT) de tümörün köken aldığı hücre tipini belirleyerek doğru bir histogenetik sınıflandırma yapmak amacıyla immunohistokimya (İHK) histopatolojide 1970'lerin başından beri uygulanmaktadır. Diagnostik sitopatolojide ise İSK tekniğinin kullanımına ait ilk önemli rapor Nadji¹ tarafından 1980'de yayınlanmış olup, çeşitli çalışmalarda farklı fiksasyon ve boyama yöntemleri kullanılmıştır.^{2,3} Özellikle arşiv preparatlarının değerlendirilmesi amacıyla %95'lik alkolde fikse edilmiş, PAP ile boyanmış sitolojik materyalde "soldurma" yöntemiyle İSK'nın uygulanabilirliği önerilen yöntemlerden biridir.^{4,5} Bu çalışmada YDT'nden İİAB ile elde edilen sitolojik materyalde spesifik tanıya ulaşmada İSK'nın rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ağustos 1992-Kasım 1993 tarihleri arasında Haydarpaşa Numune Hastanesi Cerrahi, Ortopedi ve Dahiliye Klinikleri'ne başvuran, klinik ve radyolojik olarak yumuşak doku tümörü düşünülen, sonrasında histolojik materyal elde edilen 37 hasta çalışmaya dahil edildi. Yüzeysel kitlere tarafımızdan, derin kitlelere US veya BT eşliğinde radyologlar tarafından standart yöntemle göre^{6,7,8} İİAB uygulandı. Direkt yayma ve sitosantrifüj preparatları %95'lik alkolde fikse edi-

İlerik Papanicolaou yöntemi ile boyandı. Sonuçlar, eksizyonel, insizyonel, tru-cut biopsi ya da total eksizyon materyali ile karşılaştırıldı. Sitolojik materyal ilk aşamada baskın olan morfolojik özelliklerine göre 6 ana başlık (fuziform, pleomorfik, yuvarlak hücreli, epitelooid, miksoid, lipomatöz tümörler ve diğerleri) altında toplandı. İkinci aşamada diğer sitolojik parametreler (se-lülarite, pleomorfizm, atipi, nekroz ve mitoz), klinik ve radyolojik bulgular kullanılarak benign, malign ve sınır olarak sınıflandırıldı. Üçüncü aşamada alt gruplar içinde her bir tümör için ayırıcı tanı spektrumu oluşturularak spesifik tanı veril-meye çalışıldı. Son aşamada, spesifik tanıya ulaşılamayan olgularda oluşturulan ayırıcı tanı spektrumuna uygun antikorlar seçilerek her ol-guya özgün panel oluşturuldu ve İSK sonuçları ile birlikte spesifik tanıya ulaşılmaya çalışıldı. Her bir olgu için en az 1, en çok 7 antikor uygulandı. Tablo 1'de İSK'da kullanılan primer anti-korlar yer almaktadır. Ayrıca İİAB ile spesifik tanı verilen 21 olgu içerisinde tanıları diğerleri-ne göre görece olarak daha özgün olan 10 olgu-da verilen spesifik tanı doğrultusunda kısıtlı sayıda antikor seçilerek tanıları doğrulayıp doğrula-madığı araştırıldı.

TABLO 1: Kullanılan primer antikorlar

- Vimentin (Vim)
- Desmin (DES)
- S. 100 protein (S.100)
- Cytokeratin (CK) (AE1/AE3)
- Factor VIII-Related Antigen (F.VIII)
- Leukocyte Common Antigen (LCA)
- Neuron Specific Enolase (NSE)
- Neurofilament (NF)
- Epithelial Membran Antigen (EMA)
- Alpha 1 Antichymotripsin (α -1 Atcy.)*
- Myoglobin (Myg)
- Lyszyme (Lys)*

* polyclonal, rabbit
Diğerleri monoklonal, mouse

Bu amaçla tümü PAP yöntemi ile boyanmış pre-paratlarda hücreden zengin alanlar lamaların arka yüzeyleri üzerinde işaretlendi. Bir lam üzerinde uygulanacak primer antikor ile elde bulunan lam sayısına göre en çok üç, en az bir alan daire içine alındı. Daha sonra keskin ile lameller ayrıl-

dı. Lamaların arka yüzeylerinde işaretli alanlar bu kez lamaların ön yüzeylerinde DAKOPEN (DAKO Corporation CA U.S.A.) ile tekrar işa-retlendi. Yaymalar rehidrate edildi. %1'lik HCL//Etil alkol ile 15 dk. oda ısısında soğurma yapılarak Alkalen Fosfataz konjuge Strepa-vidin-biotin (süpersensitif sistem-BioGenex CA, U.S.A.) sistemi ile İSK uygulandı.

İİAB ve İİAB bulgularına ek olarak İSK sonuç-ları ile varılan spesifik tanıları histolojik tanımlarla karşılaştırıldı.

BULGULAR

20 olgu kadın, 17 olgu erkek olup, yaşları 0-73 arasında değişmekteydi. Olgular sitolojik olarak 16'sı (%43.2) malign, 20'si (%54) benign ve 1'i (%2.7) sınır tümör olarak değerlendirildi.

21 (%56.7) olguda İİAB ile spesifik tanıya ulaşı-lırken, "soldurma" yöntemi ile İSK uygulandı-nda bu sayı 33'e (%89.1) yükseldi. 2 olguda (bu olgulardan biri yanlış-negatif olarak değerlendirilen dermatofibrosarkom protüberans (DFSP) ol-gusudur) İİAB ile spesifik tanıya ulaşamadığı gibi yaymaların üzeri derecede hiposelüler olma-sı nedeniyle İSK da uygulanamadı. 2 olguda (bu olgulardan biri yanlış-negatif olarak değerlendirilen epitelooid leiomyosarkom olgusudur) ise yay-gın zemin boyanması nedeniyle İSK'ya rağmen spesifik tanıya ulaşamadı. İSK'dan önce ve son-ra spesifik tanı verilen olguların dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo 3'de ise İSK uygula-nan 14 olguda kullanılan antikorlar ve boyanma sonuçları gösterilmiştir.

TABLO 2: İSK'dan önce ve sonra spesifik tanı verilen ya da verilemeyen olguların dağılımı

	İİAB ile tanı +	İİAB ile tanı -	
İSK +	21	2	23
İSK -	12	2	14
	33	4	37

Daha sonra histoloji ile karşılaştırıldığında 1 yan-lış pozitif ve 2 yanlış negatif değerlendirilme ya-pıldığı saptandı. Dejenere schwannoma olgusu İİAB ile yanlış-positif olarak değerlendirildi ve

TABLO 3: Spesifik tanı amacıyla 14 oliga kullanılan antikorlar ve sonuçları

	vim	des	s.100	CK	EMA	Mgy	α 1atcy	lys	NSE	NF	F.VIII	LCA
- Malign schwannoma	+		+	-								
- MF	+	-	-				-	-				
- MFH	+	+	-				+	+				
- RMS	+	+	-	-		-			-			-
- RMS												
- Nöroblast. om	+	+	-			-						-
- Epiteloid* leiomyosarkom												
- Malign* hemanjioperis.												
- Meninjiom	+			-	+							-
- Epiteloid hemanjiom	+	+	+									+
- Granüler hüç. tm		-	+						+	-		
- Leiomyom		+	-									
- Fibromatosis	+	-	-									
- Dejenere schwannoma		-	+									

* Bu olgularda yaygın zemin boyanması nedeniyle İSK değerlendirilememiştir.

malign fuziform hücreli tm.'ler grubuna dahil edildi. İSK'dan sonra S.100 ile boyanma nedeniyle malign schwannoma tanısı verildi. 2 yanlış-negatif değerlendirilen olgudan yukarıda bahsedildi. İİAB ile malign olarak değerlendirilen bir meninjiom olgusunda ise İSK ile doğru spesifik tanıya ulaşıldı. Olguların gruplara göre dağılımı, İSK yapılmadan önce ve sonraki tanıları histolojik tanıları ile karşılaştırılmalı olarak Tablo 4'de gösterilmiştir. İİAB ile spesifik tanı verilen 10 olguda tanıyı doğrulamak amacıyla uygulanan İSK sonuçları ise Tablo 5'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda İSK'nın İİAB'de tanı değerini yükselten bir yöntem olduğunu söyleyen çok sayıda çalışmaya rastlanılmakla birlikte, PAP ile boyanmış arşiv prepatlarında İSK'nın kullanılabilirliği kısıtlı sayıda makalede bildirilmiştir.^{4,5,9,10} Dinges ve ark.¹² bu yöntemle elde edilen sonuçların uyumsuz olduğunu söylerken, Gherardi⁴ ve Travis⁵; soldurma işlemi sırasında antijenitenin kaybolmayacağını ve boyanmanın kalitesinin iyi fiksasyona bağlı olduğunu ve alkol fiksasyonu ile

havada kurumuş preparatlardan daha iyi sonuçlar alındığını belirtmektedirler. Bu amaçla Raddomyosarkom (RMS) da İSK ve İHK'nın kullanımını araştıran bir çalışmada formaldehit ile fikse dokulara kıyasla alkol fiksasyonun düşük yoğunluktaki antikorları saptamada çok daha etkili olduğu belirtilmektedir.¹² Lam sayısının sınırlı olması, çoğu çaman pozitif sitolojik kontrollerin uygun olmaması, büyük hücre fragmanlarının ortasında yetersiz fiksasyon nedeniyle antijenitenin bozulmasına bağlı yanlış negatif ve pozitif sonuçlar, kalın yayılmış preparatlarda yoğun zemin boyanmaları, in vivo fagositik aktiviteye bağlı beklenmeyen boyanmalar, dejenere hücrelerde özgül olmayan boyanmalar, neoplastik olmayan hücrelerdeki boyanmalar yöntemin tuzaıkları olarak sıralanmakta, monoklonal antikorların kullanımı ile daha iyi sonuçlar elde edilebileceği söylenmektedir.^{4,9,13} Çalışmamızda Alkalen Fosfataz ile konjuge streptavidin-biotin sistemi ve ikisi dışında tümü monoklonal olan antikorlar kullanıldı. Zemin boyanmalarını önlemek amacıyla primer antikor ile inkübasyondan önce aynı hayvandan elde edilen immün olmayan serum ile blokaj yapıldı, endojen Alkalen Fosfataz aktivitesini önlemek amacıyla Levamisol kullanıldı,

TABLO 4: Olguların gruplara göre dağılımı, İSK'dan önceki ve sonraki tanıların histoloji ile karşılaştırılması

	Sitolojik Tanı		İSK'dan sonraki sitolojik tanı	Histolojik Tanı	
GRUP 1 Fuziform hüç. tm. (20)	Malign schwannoma	(1)	-	aynı	
	Leiomyosarkom	(3)	-	aynı	
	İnfantil fibrosarkom	(1)	-	aynı	
	DFSP	(1)	-	aynı	
	Schwannoma	(3)	-	aynı	
	Leiomyom	(3)	-	aynı	
	Fuziform hüç. lipom	(1)	-	aynı	
	Fibromatosis	(1)	-	aynı	
	Fuziform hüç. malign tm.	(4)	-	aynı	
				Malign schwannoma	aynı
				Malign schwannoma	Dejenere schwannoma
				Fuziform hüç. malign tm	Malign hemanjioperistom
				Meninjiom	aynı
		Fuziform hüç. benign tm	(2)		aynı
GRUP 2 Pleomorfik hüç. tm. (4)	MFH	(1)	MFH	aynı	
	Pleomorfik hüç. malign tm.	(2)	MFH	aynı	
			RMS	aynı	
GRUP 3 Yuvarlak hüç. tm. (2)	Yuvarlak hüç. malign tm.	(2)	RMS	aynı	
			Nöroblastom	aynı	
GRUP 4 Epiteloid tm. (3)	Epiteloid benign tm.	(3)	Granüler hüç. tm	aynı	
			Epiteloid hemanjiom	aynı	
			Epiteloid benign tm	Epiteloid leiomyosar.	
GRUP 5 Miksoid tm. (3)	Miksoid liposarkom	(1)	-	aynı	
	miksoid benign tm.	(2)	-	DFPS	
			-	Schwannoma	
GRUP 6 Lipomatöz tm. ve diğerleri (5)	Lipom	(3)	-	aynı	
	Hemangiom	(1)	-	aynı	
	Tendinöz ksantom	(1)	-	aynı	

yaymaların kurumaları engellendi, kromojen ile inkübasyon süresi olabildiğince kısa tutuldu. (Bu sürenin uzamasının zemin boyanmasını artırdığını düşünüyoruz.) Ayırıcı tanı amacıyla İSK kullandığımız 12 olgunun sadece ikisinde hem zeminde hem de hücre fragmanlarında diffüz boyanma görüldü. Bu olgulardan birinde yayma oldukça kalın olup, materyal koheziv hücre fragmanlarından oluşmaktaydı. Diğer olguda ise hücre morfolojisindeki bozukluğun fiksasyon kusurunu yansıttığı düşünüldü. Az sayıda olguda değerlendirmeyi etkilemeyecek hafif zemin boyanmaları görüldü. Lam sayısı tek bir olguda yeterli sa-

yıda değildi. Fakat bu olguda da uygun tek cam üzerinde üç ayrı alan işaretlenerek üç ayrı antikor uygulandı. Hiposelüler materyallerde lam üzerinde hücresel tüm alanlar işaretlenerek bir antikor için birden fazla alanda boyama yapıldı. Bir RMS vakasında İSK'da Myogloblin negatif iken İHK'da pozitif bulundu. Bu boyanma farkı, De Jong ve ark.¹² çalışmasında Myogloblin'in sitoplazmada eriyen bir protein olması nedeniyle alkol fiksasyonu sırasında yeterince korunamamasına bağlanmaktadır. Diğer antikorlar için böyle bir sorun yaşanmadı. Bir leiomyom olgusunda ise tekrarlanan İHK çalışmalarına rağ-

men pozitif boyanma elde edilemedi. İSK'da ise materyal oldukça hiposelüler olmasına rağmen Desmin ile pozitif, S.100 ile negatif boyanma leiomyom tanısına ulaştırdı. Epiteloid hemanjiom olgusunda da İSK'da Cytokeratin ile kuvvetli pozitif boyanma saptanırken, İHK'da tripsinizasyona rağmen boyanma elde edilemedi. Çalışmada uygulanan antikolar bütünüyle değerlendirildiğinde alkol fiksasyonu ve "soldurma" işleminin immünoreaktiviteyi en az rutin takip edilen parafin bloklardaki dokular kadar, hatta yukarıdaki örneklerde olduğu gibi daha fazla koruduğu gözlemlendi. Pozitif kontrol olarak histolojik kesitler kullanıldı. Negatif kontrol kullanılmadı. Özellikle Lsozyme ile neoplastik olmayan hücrelerdeki (iltihap hücrelerinde) boyanmalar neoplastik hücrelerden kolaylıkla ayrıldı.

İİAB ile verilen spesifik tanıları desteklemek amacıyla yapılan İSK'da S.100'ün schwannoma olgularında diffüz ve kuvvetli, malign schwannom olgusunda şüpheli pozitif boyanması sinir tümörlerinin bilinen immünohistokimyasal boyanma özelliği ile paralel bulundu.^{14,15} GİS düz kas tümörlerinin mezenkimal düz kas tümörlerinden yapısal olarak farklılıklar gösterdikleri, düz kasdan orjin aldıkları fakat her zaman düz kas yönünde farklılaşmadıkları söylenmektedir ve bu nedenle bazılarında GFAP ve S.100 pozitifliği de gösterilmiştir.^{14,15,16,17} Düz kas Aktin'i ve Desmin'in çoğunlukla negatif olması bizim olgularımızdaki sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Liposarkomlarda S.100 ile değişen yoğunluklarda boyanmadan bahsedilse de¹⁴, bir miksoid liposarkom olgusunda negatif sonuç elde edildi. Malign fibröz histiositom (MFH) tanısında Lysozyme, Alpha-1 antitripsin ve Alpha-1 antichimotripsin'in immünoreaktivitelerine ait farklı sonuçlar bildirilmektedir. Lysozyme'in diğer iki antikora göre daha nonspesifik boyanma oluşturduğuna dikkat çekilerek, MFH tanısının bazı özel antikoların pozitif bulunmasından çok diğerlerinin negatif olması ile konabileceği belirtilmektedir.^{14,15,19,20,21}

YDT'nde İHK gibi İSK'nın da tanı değerinin sınırlı olduğu belirtilmektedir. Buna neden olarak da, bu tümörlerin çok farklı diferansiyasyon göstermeleri ve her zaman potansiyel hata kaynağı olabilecek indifferansiye hücreler içermeleri gös-

terilmektedir.⁹ Çalışmamızda sadece bir MFH olgusunda İSK'da fokal Desmin, İHK'da ise Desmin ve S.100 pozitifliği görüldü. Bu tümörün oldukça anaplastik ve az diferansiye bir tümör olması nedeniyle beklenmedik pozitif boyanmalar tanıyı değiştirmedir.

Çalışmamızda soldurma işlemini takiben uygulanan İSK ile spesifik tanıya ulaşma oranı %56.7'den %89.4'e yükselmiştir. Doğru sonuçlar elde etmek için mümkün olduğu kadar çok sayıda yayma elde edilmeli, preparatlar ince yayılmalı ve iyi fikse edilmelidir. Soldurma işlemi sırasında antijenitenin kaybolmadığını ve alkol fiksasyonu nedeniyle varolan antijenitenin de iyi korunduğunu düşünüyoruz. Uygun yaymalarda aynı lam üzerinde birden fazla antikor uygulanabilir. Nonspesifik boyanmalar ve zemin boyanmaları, yukarıda anlatılan şekilde yonteme uygun olarak yapıldığında en aza indirgenecektir. Özellikle az diferansiye olgularda ektopik antijen ekspresyonunun varlığı daima gözönünde tutulmalıdır. Sonuçta İSK yumuşak doku tümörlerinde İİAB değerini önemli ölçüde arttıran yardımcı bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Nadji M: The potential value of immunoperoxidase techniques in diagnostic cytology. *Acta Cytol* 1980, 24:442-447.
2. Jonston WW, Szpak CA, Thor A, Simpson JF, Schlom J: Application of immunocytochemistry to clinical cytology. *Cancer Invest* 1987, 5:593-611.
3. Weintraub J, Redard M, Wenger D, Vassilakos P: The application of immunocytochemical techniques to routinely-fixed and stained cytologic specimens. *Path Res pract* 1990, 186:658-665.
4. Gherardi G, Marveggio C: Immunocytochemistry in head and neck aspirates. *Acta Cytologica* 1992, 36:687-696.
5. Travis WD, Wold LE: Immunoperoxidase staining of fine needle aspiration specimens previously stained by the papanicolau technique. *Acta Cytologica* 1986, 31:517-520.
6. Hajdu SI: Soft Tissue and Bone. In: Bibbo M, ed. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia: Saunders Company 1991, 502-525.
7. Qizilbash Ali H, young J, Edward M. Introduction, clinical application, biopsy and laboratory technique. In: *Guides to clinical aspiration biopsy, head and neck*. New York: Igoku-Shoin 1988, 1-14.
8. Willems JS: Aspiration biopsy Cytology of Soft Tissue Tumors. In: Linsk JA, Franzen S, Eds. *Clinical aspiration cytology*. USA: JB Lippincott Company, 1989, 365-397.
9. Chess Q, Hajdu SI: The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. *Acta Cytologica* 1986, 30:1-7.
10. Nguyen DK: What is the value of fine needle aspiration biopsy in the cytodiagnosis of soft tissue tumors. *Diagn Cytopathol*

1988, 4:352-355.

11. Dinges HP, Wimberger G, Höfler H: Immunocytochemistry in cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 1989, 11:22-32.
12. De Jong ASH, Kessel-van Vark MV, Heerde PV: Fine needle aspiration biopsy diagnosis of rhabdomyosarcoma. *Acta Cytologica* 1987, 31:573-577.
13. Tao LC: Sarcomas. In: *Transabdominal fine-needle aspiration biopsy*. New York: Igaku-Shoin 1990:256-302.
14. Enzinger ME, Weiss SW: *Soft tissue tumors*. (2nd ed) ST. Louis. The C.V. Mosby Company, 1988.
15. Miettinen M: Immunohistochemistry of soft tissue tumors. *Pathol Ann* 1990, 25:1-36.
16. Lagrange W: Fine needle aspiration biopsy of myxoid variant of malignant leiomyoblastoma metastatic to the liver. *Acta Cytologica* 1988, 32:443-446.
17. Hendrickson MR, Kempson RL: Smooth muscle tumors. In: Whitehead R. ed. *Gastrointestinal and oesophageal pathology*. London: Churchill Livingstone 1989, 619-628.
18. Kawahara E, Nakanishi I, Kuruda Y, Morishita T: Fine needle aspiration biopsy of primary malignant fibrous histiocytoma of the lung. *Acta Cytologica* 1988, 32:226-230.
19. Sapi Z, Papp H, Bodo M: Malignant fibrous histiocytoma of the esophagus. *Acta Cytologica* 1991, 36:121-125.
20. Soini Y, Miettinen M: Alpha-1-antitrypsin and lysozyme. Their limited significance in fibrohistiocytic tumors. *Am J Clin Pathol* 1989, 91:515-521.
21. Strauchen JA, Dimtriu-Bona AD: Malignant fibrous histiocytoma. *Am J Pathol* 1986, 124:303-309.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000