

N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay Kompleksinin Tc-99m ile Bağlanmasında Reaksiyon Denge Sabitlerinin ve Çeşitli Çözücü Sistemlerin İnce Tabaka Kromatografisi ve Otoradyografik Analiz Metodlarıyla İncelenmesi

Gönül AKSÜT
Şeydi V. AKSUT
Yüksel SABIKAYA

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nükleer Tıp ve Kardioloji Bilim Dalları ile
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi
Fiziko-Kimya Bilim Dalı, Ankara

DETERMINATION OF REACTION STABILITY CONSTANTS
FOR THE BINDING OF Tc-99m WITH N-ACETYL-D-
PENICILLAMIN + TIN COMPLEXES THE METHODS OF
THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND
AUTORADIOGRAPHIC ANALYSIS

Geliş tarihi: 28 Ağustos 1984

ÖZET

Tıpta yeni bir radyodiyagnostik ajan elde edilebilirliğini araştırmak amacıyla bir ön çalışma olarak, değişik oran ve koşullarda hazırlanan N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay komplekslerinin reaksiyon denge sabitleri incelenmiştir. Deney sonuçlarından, iki ayrı denge basamağı belirlenmiş olup, bunlardan birinin bir geçiş basamağı oluşturduğu, asıl reaksiyon olan diğerinin denge sabitinin ise $p^A = 8.3 - 7.5$ dolaylarında değiştiği belirlenmiştir.

Bu kompleksin, çeşitli çözücü sistemlerle, ince tabaka kromatografisi yöntemiyle incelenmesinden, en uygun çözücü sistemin % 10 CH_3COONH_4 (amonyum asetat) ve saf CH_3OH (metil alkol)'un 2/1 oranındaki karışımı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu kompleksin Tc-99m radyoizotopu ile işaretli bileşiğinin otoradyografik yöntemle incelenmesinde en uygun banyo sisteminin 8/3 oranında hazırlanmış olan Asetil Nitrit/N-Propanol ve Asetonitril/Etanol sistemleri olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Tc-99m, N-Asetil-D-Penisilamin (NADP), ince Tabaka Kromatografisi (İTK), Otoradyografik analiz

T Kİ Tıp Bil Araştırma Der c.3, 5.3. 221-227, 1985

Bu çalışmada kullanılan N-Asetil-D-Penisilamin bileşiği, sülfidril içeren 3-Merkapto Valin veya B-B-dimetil sistinin D-izomeri olan D-Penisilamin'in amin grubunda azot atomuna asetil grubu bağlanmış izomeridir:

Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri ARAŞTIRMA Dergisi C.3, S.3, 1985
Turkish Journal of RESEARCH in Medical Sciences V.3, N.3, 1985

SUMMARY

In this study, in order to investigate for being obtained if any new rediodiagnostic agent in medicine, N-Acetyl-D-Penicillamine + tin complexes were prepared in different ratio and conditions, then their reaction stability constants were studied as a pre-work.

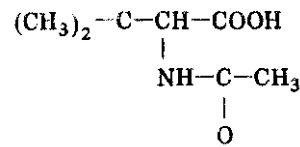
Almost each experiment showed two different reaction stability constants. While one of them existed as a temporary step but the other one seem as main stability constant in the reaction, they were observed between the values of $p^A = 8.3 - 7.5$.

We determined that the most appropriate solvent system for this complex under these conditions was the mix solution of 10 % CH_3COONH_4 and pure CH_3OH with 2/1 ratio among the testing various solvent systems by using thin layer chromatography method. In addition, after labelling this complex with Tc-99m radioisotope, we determined that the optimal bath system for this complex when was tested by using auto-radiographic method was the mix solution of acetyl nitrite/N-Propanol and acetonitrile/Ethanol systems prepared with 8/3 ratio.

Key words: Tc-99m N-Acetyl-D-Penicillamine (NADP), Thin Layer Chromatography (TLC), Autoradiographic analyse.

T J Research Med Sci V.3, N.3. 221-227, 1985

SH



N-Asetil-D-Penisilamin

Molekül yapısında sülfidril grubu içeren N-Asetil-Amino asitlerden olan N-Asetil-D-Penisilamin, penisilinin basit bir türevi olup, sentetik olarak üretilebilir (1). Stereoizomerlerin bu D-tipleri, doğal olarak bulunabilen en az zehirli bileşiklerdendir. Kuvvetli çelât yapıcı bir özelliğe sahiptir. Wilson hastalığı (hepatolentikular degenerasyon), sistinüri ve metal zehirlenmelerinde, bakımı vücuttan atılması amacıyla kullanılmaktadır (2).

Başlıca kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi, elektroforez, jel filtrasyon, otoradyografi gibi değişik analiz yöntemleri bu komplekslerin incelenmesinde uygulanabilir (3, 4, 5, 6). Bu çalışmada ise ince tabaka kromatografisi kullanılarak N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay Kompleksleri ve bu komplekslerin Tc-99m radyoizotopi ile etiketlenmiş bileşikleri incelenmiştir (3, 6, 7, 8). Çalışmayı üç bölüm altında toplayabiliriz:

1. N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay kompleksi oluşumunda reaksiyon denge sabitlerinin belirlenmesi,
2. Çeşitli oranlarda hazırlanan çözücü sistemlerde N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay kompleksinin ince tabaka kromatografisi yöntemiyle incelenmesi,
3. N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay kompleksinin Tc-99m radyoizotopi ile bağlanmasının otoradyografik yöntemle çeşitli çözücü sistemlerde izlenmesi.

METOD VE SONUÇLAR

Reaksiyon denge sabitlerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere, bir distile su ile 50 mg/ml N-Asetil-D-Penisilamin ve 0.01 N ve 1.0 N HCl ile de 225.8 mg/3.9 ml ve 1 mg/ml'lik konsantrasyonlarda $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bunlarla hazırlanan çeşitli oranlardaki karışım çözeltilerinden alınan numuneler, 2.0, 2.5 ve 1.0 N NaOH çözeltileriyle titre edilmişlerdir (9). Karışımların başlangıç pH değerlerinden çıkılarak, titrasyonda harcanan NaOH miktarlarına karşı ölçülen pH değerleriyle titrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 1-3). Böylece reaksiyonda var olabilecek denge basamaklarının belirlenmesi sağlanmıştır (Tablo 1).

İnce tabaka kromatografisi için 2.5 x 10 cm ebadında hazırlanan 1112 (silika jel) ve IB2-F (flo-rasan) cinsi olmak üzere iki farklı ince tabaka kromatografi şeridi kullanılmıştır. 50 mg/ml N-Asetil-D-Penisilamin ve 1 mg/ml $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltileriyle çeşitli oranlarda hazırlanan karışım çözeltilerinden ince uçlu damlalıklarla şeridin alt ucundan 1 cm mesafeye damlatılmıştır. Şerit hava ile kurutulduktan sonra, değişik oranlarda amonyum asetat ve metil alkol içeren sistemlerde ayırma bırakılmıştır. Daha sonra alınan şeritler tekrar kurutulup, ayrılan fazlamı görünürlüğünü sağlamak amacıyla,

üzerlerine % 0.5 ve % 1'lik Nmhidrin ve di fenil karbazid çözeltileri püskürtülmüştür. Çözücü sistem ve reaktif karışımı oranlarına göre belirlenen Rf değerleri Tablo-2'de verilmektedir (8).

Otoradyografik metotla Tc-99m radyoizotopuyla N-Asetil-D-Penisilamin+Kalay kompleksinin bağlanmasının incelenmesinde 50 mg/ml N-Asetil-D-Penisilamin ve 1 mg/ml $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltilerinden çeşitli oranlarda karışımlar hazırlanarak, jeneratörden % 0.9 NaCl çözeltisi ile sağılan 1 mCi'lik (99mTc) perteknetat çözeltisine eklenmiştir (6, 8, 10, 11). Karışım çözeltisi bir manyetik karıştırıcı ile iyice karıştırıldıktan sonra ince tabaka kromatografisi yöntemiyle otoradyografik olarak Rf değerleri tayin edilmiştir. Böylece deney şartlarında en uygun çözücü sistemin araştırılması ve en yüksek bağlanma oranının elde edildiği koşulları tespit etmek amacıyla yapılan denemelerden elde edilen veriler Tablo 3'de verilmektedir.

TARTIŞMA

Şekil 1-3 incelemesinden anlaşılacağı gibi titrasyonun çoğunluğunda iki ayrı denge basamağı gözlenmektedir. Bunlara ait reaksiyon denge sabiti değerleri Tablo-3'te pK_{A1} ve pK_{A2} olarak verilmektedir. Bu değerlerden birisinin diğeri ile mukayesesinde bir geçiş basamağı teşkil ettiği, esas olarak kabul edilen reaksiyon denge sabiti değerinin ise pK_A = 6.3 — 7.5 arasında benzer değişimler gösterdiği görülmektedir.

Tablo-2'de belirtilen Rf değerlerinin incelenmesinden anlaşılacağı gibi N-Asetil-D-Penisilamin+Kalay kompleksinin ince tabaka kromatografisi metoduyla belirlenmesinde en uygun banyo sisteminin çeşitli oranlarda denenilen % 10 AcONILj. ve saf MeOH'un 2:1 oranındaki karışımı olduğu ve kıyaslanan her iki tip IB2 ve IB2-F ince tabaka plakalarının da bu işlemlerde birbirlerinden farklı özellik göstermedikleri anlaşılmıştır.

Radyokromatografik metotla elde edilen Rf değerlerinin Tablo-3 incelenmesi şu bulgularla değerlendirilebilir:

1. Radyokromatografik ayırmayla, karışım reaksiyonu sonucu, ortamda üç farklı Rf değeriyle üç tip bileşiğin varlığı belirlenmiştir:
 - a) 99mTc-Sn-N-Asetil-D-Penisilamin kompleksi; Rf = 0.7 - 0.8
 - b) 99mTc 04 (perteknetat) yapısındaki (+7) değerlikli, reaksiyona girmemiş serbest (bağlanmamış) teknesyum; Rf = 1.0
 - c) 99mTc02 yapısında (+4) değerlikli, ortamdaki reaksiyon fazlası kalay iyonları tarafından indirgenerek kolloidal hale geçmiş (indirgenmiş) teknesyum; Rf = 0

- Perteknetat (99ı»Tc04) halinde jeneratörden sağılan teknesyum çözeltisinin, ortamda kalay iyonları olmaksızın, yalnızca N-Asetil Amino Asit bileşiği ile herhangi bir kompleks oluşturmadığı ve bütün çözücülerde 99°Te(J4 çözeltisi gibi davrandığı, aynı Rf değerinin elde edilme-siyle anlaşılmıştır.
- 99nıTcÜ4 çözeltisinin SiiCl2.2H.20 çözeltisiyle karışımında, ortamda mevcut bütün teknesyumu nun, kalay iyonları ile (+7)den (+4) değeri-liğe indirgenip 99mTcQ2 yapısındaki koloidal teknesyumu oluşturduğu saptanmıştır

Yine Tabloların incelenmesinden anlaşılacağı gibi, 50 mg/ml N-Asetil-D-Penisilamin ve 1 mg/ml Sıt;İ.2.11^0 ana çözeltilerinin 1:1 oranındaki karışı-mının 1 mCi'lik 99mxc04 çözeltisiyle en yüksek oranda bağlanma yaptığı, bunun radyokromatografik metotla tesbitinde ise en uygun banyo sisteminin

8:3 oranında hazırlanmış olan ACN: N-Prop ve ACON: etOH karışımları olduğu gözlenmiştir. Bu şartlarda karışım ortamında, reaksiyon sonucu oluş-an 3 değişik bileşiğin en belirgin ayınım gerçekleş-miştir. Burada

serbest teknesyum (99m_{v.o.}) için Rf = 1.0 - 0.9, koloidal teknesyum 99'''Tc02 için Rf = 0, 99mTc-Sn-N-Asetii D-Penisilamin kompleksi için de Rf = 0.7 değerleri belirlenmiştir.

Bu çalışmamızda in-vitro yöntemlerle elde etti-ğimiz bulguların, klinik bir değere haiz olması, Nükleer Tıpta kullanım sahası bulabilmesi ve hangi organ için spesifik olduğunun tesbiti yönünden in-vivo ola-rak, hayvan çalışmalarıyla desteklenmesi, ikincil bir adım olarak gerekmektedir. Bu nedenle, çalışmamızın orijinal amacına ulaşabilmesi yönünden optimal şart-larda elde ettiğimiz bu yeni radyodiagnostik ajanın, in-vivo olarak elde edilen sonuçlara göre Nükleer Tıp alanında kullanımını sağlamalıyız.

Tablo - I

Değişik Oran ve Koşullarda, N-Asetil-D-Penisilarnırı + Kalay Kompleksleri İçin Reaksiyon Denge Sabitleri

Deney Sayısı	N-Asetil-D-Penisilamin/ Sn Oranı	N-Asetil-D-Penisilamin Konsantrasyonu	SnCl ₂ .2H ₂ O Konsantrasyonu	HCl Kons.	NaOH Kons.	Başlangıç pH	Titrasyon Eğrisi Denge Sabitleri	
							pK _{A1}	pK _{A2}
1	0:1	—	225,6 mg/3,9 ml HCl	0,01N	2,0N	2,4	7,5	—
2	0:1	—	"	1,0N	2,0N	0,6	2,0	7,0
3	1:0	50 mg/ml	—	—	5,0N	2,5	7,0	11,1
4	1:0	"	—	—	2,0N	3,9	6,7	11,2
5	1:0,5	"	225,6 mg/3,9 ml HCl	1,0N	2,0N	1,0	2,1	7,0
6	1:1	"	"	1,0N	2,5N	2,2	7,0	—
7	1:1	"	225,6 mg/7,8 ml (3,9 ml su + 3,9 ml 0,01NHCl)	0,01N	2,0N	2,4	7,0	—
8	1:1	"	"	1,0N	2,0N	1,1	1,8	7,0
9	1:2	"	"	1,0N	2,0N	1,0	2,1	7,0
10	1:3	"	"	1,0N	2,0N	1,1	2,0	6,6
11	1:4	"	"	1,0N	2,0N	1,0	2,3	6,5
12	1:5	"	"	1,0N	2,0N	1,1	3,2	6,5
13	1:1	"	1 mg/ml	0,01N	2,0N	2,2	6,8	—
14	1:0,5	"	0,2 mg/ml	0,01N	1,0N	2,1	7,0	—

Tablo - II

Değişik Oranlarda Hazırlanan N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay Komplekslerinin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemiyle İncelenmesinde Çeşitli Çözücü Sistemlerin Denenmesi

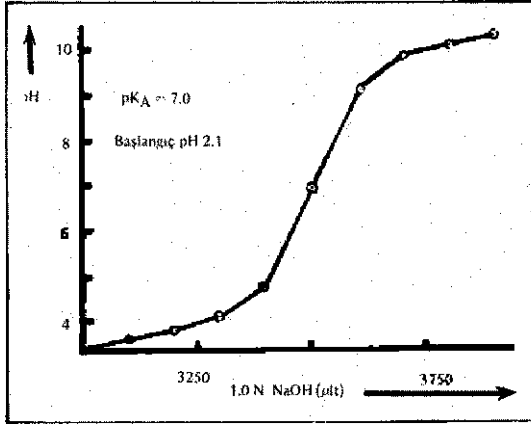
Deney Sayısı	Çözücü Sistemler	Çözücü Sistemin Karışım Oranı	İnce Tabaka Kromatografisi	Püskürtülen Reaktif	(N-Asetil-Ü-Penisilamin/Kalay) Karışımı Oranlarına Göre Belirlenen Rf Değerleri									
					Tipi									
1	% 10 ACONH ₄ Saf MeOH	1:1	IB2-F Floresan Tabakası	% 1 Difenil karbazid	Oran	1:0,5	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1	1:0	0:1	
					Rf ₁	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9		
					Rf ₂	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8		
2	"	2:1	"	"	AA:Sn	1:0,5	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1	1:0	0:1	
					Rf ₁	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8		
					Rf ₂	0	0	0	0	0	0	0		
3	"	3:1	IB2 Silika-jel plakası	% 1 Ninhidrin ve % 1 Difenil karbazid	AA:Sn	1:0,5	1:1	1:2	1:3	2:1	1:0	0:1		
					Rf ₁	-	-	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9		
					Rf ₂	-	-	-	-	-	-	-		
4	"	2:1	"	% 0,5 Ninhidrin % 1 Difenil karbazid	AA:Sn	1:0	0:1							
					Rf ₁	0,9	-							
					Rf ₂	-	0							
5	"	10:1	"	% 0,5 Ninhidrin ve % 1 Difenil karbazid	AA:Sn	1:0	0:1							
					Rf ₁	0,8	-							
					Rf ₂	-	-							
6	Karşılaştırma Denemesi	3:1	IB2-F ve IB2 Floresan ve Silika- jel plakaları	"	AA:Sn	IB2-F	1:0	0:1		IB2	1:0	0:1		
					Rf ₁		0,9	-			0,8	-		
					Rf ₂		-	0			-	0,7		
7	Saf MeOH	1:0	IB2 Silika-jel plağı	"	AA:Sn	1:0	0:1	0:0	(% 1'lik HCl ile)					
					Rf ₁	0,9	-	-	0,9					
					Rf ₂	-	0	-	0					
8	Saf MEOH	1:0	"	% 0,5 Ninhidrin Sıcak hava ile kurutulduktan sonra	AA:Sn	1:0,5	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1	1:0	0:1	
					Rf ₁	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9	-	
					Rf ₂	-	-	-	-	-	-	-	0	
9	% 85 MeOH + Su	% 85	"	"	AA:Sn	1:0,5	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1	0:1	-	
					Rf ₁	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	-	
					Rf ₂	-	-	-	-	-	-	-	0	

Tablo - III

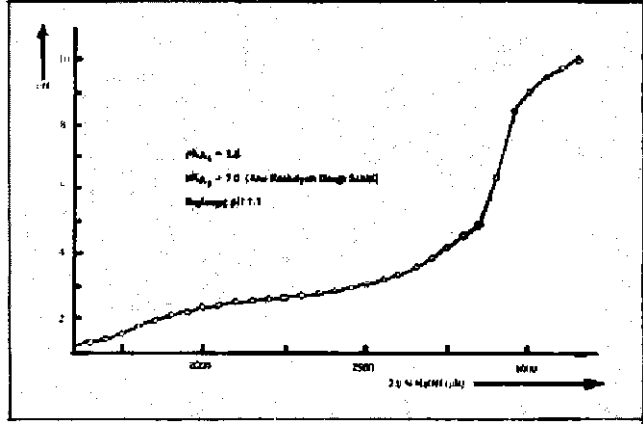
99m^{Tc}'i, Çeşitli Oranlardaki N-Asetil-D-Penisilamin + Kalay Kompleksi İle Bağlanmasının
Radyokromatografik Yöntemle İncelenmesinde En Uygun Çözücü Sistemin Araştırılması

Deney Sayısı	Çözücü Sistem	Çözücü Karışım Oranı	99m ^{Tc} İle Bağlanan Çeşitli Oranlardaki N-Asetil-D-Penisilamin-Kalay Kompleksleri İçin Belirlenen Rf Değerleri								
			Rf	0:0	0:1	1:0	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
1	MeOH:AcONH ₄	10:1	Rf ₁	—	—	—	0,7	—	—	—	—
			Rf ₂	0,9	—	0,9	0,9	—	—	—	—
			Rf ₃	—	0	—	0	—	—	—	—
2	Saf MeOH	Saf	Rf ₁	—	—	—	0,9	—	—	0,9	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	1,0	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	0	—	0	—	—	0	—
3	Piridine:EtOH	9:1	Rf ₁	—	—	—	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4
			Rf ₂	0,7	—	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6
			Rf ₃	—	0	—	—	0,1	0	0,1	0
4	AcON:EtOH	8:3	Rf ₁	—	—	—	0,6	—	—	0,6	—
			Rf ₂	0,9	—	1,0	0,9	—	—	0,9	—
			Rf ₃	—	0	—	0	—	—	0	—
5	ACN:N-Prop	8:3	Rf ₁	—	—	—	0,7	—	—	0,7	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	1,0	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	0	—	0	—	—	0,2	—
6	ACN:Tribütüilamin	19:1	Rf ₁	—	—	—	0,6	—	—	0,6	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	0,9	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	0	—	0	—	—	0	—
7	ACN:Tribütüilamin	99:1	Rf ₁	—	—	—	—	—	—	—	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	1,0	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	0	—	—	—	—	—	—
8	ACN:N-Prop	2:1	Rf ₁	—	—	—	0,3	—	—	0,3	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	1,0	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	0	—	0	—	—	0	—
9	ACN:N-Prop	4:1	Rf ₁	—	—	—	0,5	—	—	0,4	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	1,0	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	—	—	—	—	—	—	—
10	ACN:N-Prop	8:3 + % 10 Dietilen	Rf ₁	—	—	—	0,2	—	—	0,2	—
			Rf ₂	0,5	—	0,5	0,6	—	—	0,6	—
			Rf ₃	—	0,1	—	0,1	—	—	0,1	—
11	ACN:N-Prop	8:3 + % 1 Su	Rf ₁	—	—	—	0,6	—	—	0,6	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	1,0	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	—	—	—	—	—	—	—
12	MeOH:Su	% 85 + % 15	Rf ₁	—	—	—	0	—	—	0	—
			Rf ₂	1,0	—	1,0	0,9	—	—	1,0	—
			Rf ₃	—	0	—	0	—	—	0	—

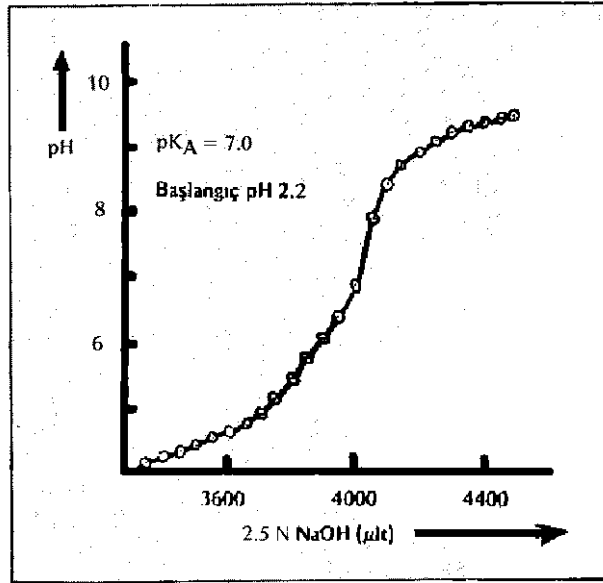
Rf₁ = Rf kompleks, Rf₂ = Rf (TcO₄⁻), Rf₃ = Rf(TcO₂)



Şekil-1.50 mg/ml N-Asetil-D-Penisilamin + 0.2 mg/ml SnCl₂.2H₂O (0.01 N HCl ile) 1:0.5 Oranındaki Karışım Çözeltisinin 1.0 N NaOH Çözeltisi ile Titrasyon Eğrisi.



Şekil-2. 50 mg/ml N-Asetil-D-Penisilamin + SnCl₂.2H₂O (225.6 mg/7.8 ml (3.9 ml su + 3.9 ml 1.0 N HCl)) 1:1 Oranındaki Karışım Çözeltisinin 2.0 N NaOH Çözeltisi ile Titrasyon Eğrisi.



Şekil-3. 50 mg/ml N-Asetil-D-Penisilamin + SnCl₂.2H₂O (225.6 mg/3.9 ml) 1:1 Oranındaki Karışım Çözeltisinin 2.5 N NaOH Çözeltisi ile Titrasyon Eğrisi.

KAYNAKLAR

1. Stecher PO, ed.: The Merck Index, 5 th ed., Railway, N.J, Merck, p. 789, 1968.
2. Rodger W, Griffin Jr: Modern Organic Chemistry. McGraw-Hill Book Company, Tokyo, Japan, 1969.
3. Tubis M, GT Krishnamurty, JS Endow, et al: 99mTc-penicillamine, a new cholescintigraphic agent, J. Nucl. Med., 13:652-654, 1972.
4. Smith I: Chromatographic and electrophoretic techniques. William Heinemann Medical Books, Ltd., London, 1968.
5. Ilafman E: Chromatography: A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods, 3rd ed., Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1975.
6. Subramanian G: Preparation and Quality Control of Radiopharmaceuticals, Upstate Medical Ccn., New York, 1978.
7. Krishnamurty GT, M Tubis, JS Endow, et al: 99mTc-penicillamine cholescintigraphy. Radiology, 115:201-204, 1975.

8. Mitta AEA, J Alvarez, P Raban: Determination of free ^{99m}Tc in labeled compounds by means of thin layer chromatography. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 22:223-225, 1971.
9. Tsvet M: *Ber. Dent. Ges.*, 24 :384, 1906, English translation by Strain III, J Sherma; *J. Chem. Educ.*, 44:235, 1967.
10. Gutkowski RF, HJ Dworkin: A simplified radiochromatographic purity check. *J. Nucl. Med.*, 12:513-515, 1971.
11. Billingham MW: Chromatographic quality control of ^{99m}Tc -labeled compounds. *J. Nucl. Med.*, 14: 793-797, 1973.